



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:  
DISEÑO Y EVALUACIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS

**“DESARROLLO DE DOS FORMAS FARMACÉUTICAS PARA EL SISTEMA  
VACUNAL ALMIDÓN-DFAtag-ANTÍGENOS.”**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

PAULINA LANDON VAZQUEZ  
MATRÍCULA:2172800030

COMITÉ TUTORIAL

Co-Tutora: Dra. Luz María Melgoza Contreras  
Co-Tutora: Dra. Romina Ma. de la Paz Rodríguez Sanoja  
Asesor: Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta

DICIEMBRE, 2019

“DESARROLLO DE DOS FORMAS FARMACÉUTICAS PARA EL SISTEMA  
VACUNAL ALMIDÓN-DFAtag-ANTÍGENOS”

COMITÉ TUTORAL.

Cotutora

---

Vo.Bo. Dra. Luz María Melgoza Contreras

Cotutora

---

Vo.Bo. Dra. Romina Ma. de la Paz Rodríguez Sanoja

Asesora

---

Vo.Bo. Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta

Alumna

---

Q.F.B Paulina Landón Vázquez

“DESARROLLO DE DOS FORMAS FARMACÉUTICAS PARA EL SISTEMA  
VACUNAL ALMIDÓN-DFATAG-ANTÍGENOS”

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO.

Presidente

---

Dra. Beatriz Ruiz Villafán

Vocal

---

Dr. Daniel Alejandro Guillén Santos

Secretario

---

Dra. Luz María Melgoza Contreras

## RESUMEN

Las vacunas como cualquier medicamento, requieren una forma farmacéutica que garantice y facilite su producción, almacenamiento y especialmente que permita conservar su actividad biológica a largo plazo. En este estudio se desarrollaron dos formas farmacéuticas para la administración oral e intranasal del sistema vacunal almidón-DFAtag-antígenos, constituido por una proteína antigénica (el fragmento C de la toxina del tétanos (Tc)) fusionada con un Dominio de Fijación al Almidón (DFAtag) que permite la inmovilización del antígeno a micropartículas de almidón, las cuales sirven como vehículo para su administración vía oral e intranasal. Para la vía oral se fabricaron comprimidos con recubrimiento entérico y para la vía intranasal una suspensión con un disolvente mucoadhesivo. Para ambas formas farmacéuticas se evaluó la integridad mediante las técnicas de SDS-PAGE y western blot, donde se pudo corroborar cualitativamente que la proteína recombinante conservó su integridad en cada una de las formulaciones, por lo que se procedió a evaluar su eficacia en un modelo animal. La evaluación *in vivo* se realizó en conejos raza Nueva Zelanda sanos de 1.5 kg, que fueron inmunizados por las vías oral e intranasal en un esquema convencional de tres inmunizaciones con intervalo semanal y un refuerzo al día 35, con la vacuna con y sin forma farmacéutica. En todos los casos se evaluó la respuesta sistémica de anticuerpos IgG antígeno específica (anti-Tc), observándose que el título fue mayor para los grupos que recibieron la vacuna sin forma farmacéutica. También se evaluó la respuesta inmune celular, mediante la cuantificación de la citocina INF- $\gamma$  en cultivo de células de bazo de los conejos inmunizados, encontrándose que la vacuna, sin importar si se encontraba incluida o no en la forma farmacéutica, no inducía dicha respuesta en los conejos. Este trabajo representa el primer reporte que corrobora la inmunogenicidad y seguridad del sistema vacunal almidón-DFAtag-antígenos, en un modelo animal más grande y que a diferencia del ratón no es singénico. También representa la primera aproximación de formulación de esta vacuna preparada a base de almidón, y abre perspectivas para la búsqueda de una formulación adecuada.

Este trabajo fue financiado por los proyectos UNAM DGAPA-PAPIIT IN216419 e IN209316

Agradezco a:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada, con número de referencia 842661.

Mi comité tutorial integrado por la Dra. Luz María Melgoza Contreras, Dra. Romina Rodríguez Sanoja y Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta quienes siempre amablemente estuvieron dispuestas a ayudarme y por dar seguimiento a mi trabajo.

Mi comité sinodal, constituido por la Dra. Beatriz Ruiz Villafán y el Dr. Daniel Alejandro Guillén Santos, por leer y corregir mi manuscrito buscando siempre la mejora.

El laboratorio de Farmacotecnia (N110), del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-X

El laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología C034 del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM

La Unidad de Constatación de Productos Químico-Biológicos y Bioterio FMVZ de la UNAM, en especial Biol. Ernesto Enríquez Enríquez, MVZ. Julio César Sánchez Lemus, MVZ Karina Jiménez Morales por el apoyo y las facilidades brindadas.

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo fue financiado por los proyectos UNAM DGAPA-PAPIIT IN216419 e IN209316

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Este logro se lo dedico a mis padres Leandro y Alejandra, por confiar y creer en mis sueños y expectativas, por los consejos, valores y principios que me han inculcado. A mis hermanos Gustavo, Sinahi, Montse y Leandro por estar siempre presentes, acompañándome brindándome motivación, confianza y amor incondicional.

A Héctor por ser mi soporte para concluir este proyecto al brindarme amor, apoyo comprensión y paciencia.

A mi amada hija Camila por ser mi fuente de inspiración y motivación.

A todas las personas que me han apoyado y acompañado en esta etapa aportando a mi formación tanto profesional y como ser humano, en especial a Araceli que ha estado presente en muchas etapas de mi vida. También quiero agradecer a mis compañeros de la maestría y amigos del laboratorio: Alma, Jocelin, Carlos, Nathaly, Daniel, Alejandra, Brenda, Betzabeth, Priscila, Roció, Gabriela, Cynthia, Erika, Lilian y Uriel por su gran amistad que me brindaron y su valioso apoyo.

## INDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	11
2.	ANTECEDENTES .....	12
2.1.	Sistema Vacunal almidón-DFAtag-Antígenos .....	12
3.	MARCO TEÓRICO .....	15
3.1	Vacunas.....	15
3.1.1	Clasificación de las vacunas .....	16
3.1.1.1	Vacunas de Subunidades .....	17
3.1.1.2	Adyuvantes y sistemas de entrega.....	17
3.1.2	Vías de administración de las vacunas .....	20
3.1.2.1	Vacunas mucosales.....	20
3.1.3	Formulación de vacunas .....	23
3.1.3.1	Formulación de vacunas atenuadas.....	24
3.1.3.2	Formulación de vacunas inactivas, conjugadas y de subunidad.....	25
3.1.4	Formas farmacéuticas de las vacunas .....	27
3.2.	Formas farmacéuticas para la administración de vacunas mucosales .....	28
3.2.1	Formas farmacéuticas para la administración de vacunas mucosales .....	29
3.2.2	Formulación de comprimidos.....	30
3.2.3	Proceso de fabricación de comprimidos.....	31
3.2.3.1	Compresión directa.....	32
3.2.4	Recubrimiento de comprimidos.....	33
3.2.4.1	Recubrimiento pelicular entérico.....	33
3.2.2	Formulaciones nasales.....	34
3.2.2.1	Tipos de formulaciones para la administración nasal.....	36
3.2.2.2	Polímeros mucoadhesivos.....	37
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
5.	HIPÓTESIS .....	39
6.	OBJETIVOS.....	39
6.1.	OBJETIVO GENERAL.....	39
6.2.	OBJETIVOS PARTICULARES .....	39
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
7.1	Reactivos .....	40
7.2	Elaboración de la forma farmacéutica oral para el sistema vacunal almidón-DFAtag-antígenos.....	41
7.2.1.	Efecto de la compresión sobre la estructura del almidón.....	41
7.2.2.	Fabricación de los comprimidos de TcDFAtag-almidón .....	43

7.2.3. Recubrimiento pelicular entérico de los comprimidos de TcDFAtag-almidón .....	43
7.3. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de la compresión y recubrimiento de película entérico sobre la integridad de la vacuna. ....	44
7.3.1 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de la compresión y recubrimiento entérico sobre la proteína $\alpha$ -amilasa .....	44
7.3.2 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de la compresión y recubrimiento entérico sobre la proteína recombinante TcDFAtag .....	46
7.4. Elaboración de la forma farmacéutica intranasal para el sistema vacunal almidón-DFAtag-antígenos.....	47
7.5. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de la inclusión del mucoadhesivo sobre la integridad de la vacuna. ....	47
7.5.1 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de la inclusión del mucoadhesivo sobre la integridad de la proteína $\alpha$ -amilasa.....	47
7.5.2 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de la inclusión del mucoadhesivo sobre la integridad de la proteína recombinante TcDFAtag .....	48
7.6. Protocolo de inmunización y toma de muestras. ....	49
7.7. Evaluación de la actividad biológica <i>in vivo</i> .....	51
7.7.1. Respuesta inmune humoral: Detección de anticuerpos .....	51
7.7.2. Respuesta inmune celular: estímulo <i>in vitro</i> de esplenocitos y cuantificación de INF- $\gamma$ en sobrenadante.....	51
8. RESULTADOS .....	53
8.1 Elaboración de la forma farmacéutica oral para el sistema vacunal almidón-DFAtag-antígenos.....	53
8.1.1. Efecto de la compresión sobre la estructura del almidón .....	53
8.1.2. Controles de calidad de los comprimidos de Tc-DFAtag-almidón .....	54
8.1.3. Recubrimiento pelicular entérico a los comprimidos de TcDFAtag-almidón .....	55
8.2 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de la compresión y recubrimiento de película entérico sobre la integridad de la vacuna. ....	57
8.2.1 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de la compresión y recubrimiento entérico sobre la proteína $\alpha$ -amilasa .....	57
8.2.2 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de la compresión y recubrimiento entérico sobre la proteína recombinante TcDFAtag .....	58
8.3 Elaboración de la forma farmacéutica intranasal para el sistema vacunal almidón-DFAtag-antígenos.....	60

8.4 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de la inclusión del mucoadhesivo sobre la integridad de la vacuna.....	62
8.4.1 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de la inclusión del mucoadhesivo sobre la integridad de la proteína $\alpha$ -amilasa.....	62
8.4.2 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de la inclusión del mucoadhesivo sobre la integridad de la proteína recombinante TcDFAtag .....	63
8.5 Evaluación de la actividad biológica <i>in vivo</i> de la vacuna .....	64
9. DISCUSIÓN.....	65
10. CONCLUSIONES.....	70
11. REFERENCIAS .....	71
12. ANEXOS .....	79
ANEXO 1. Producción y purificación de la proteína $\alpha$ -amilasa. ....	79
ANEXO 2. Zimograma .....	79
ANEXO 3. Producción y purificación de la Proteína Recombinante TcDFAtag .....	80
ANEXO 4. Electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	82
ANEXO 5. Producción y purificación de la Proteína Tc .....	83
ANEXO 6. Obtención de Células de bazo y cultivo .....	84
ANEXO 7. Anticuerpos IgG anti Tc expresados en absorbancia .....	85
ANEXO 8. Anticuerpos IgG anti Tc expresados como título.....	88

## 1. INTRODUCCIÓN

La vacunación es una herramienta esencial para la protección y erradicación de enfermedades, sin embargo, el desarrollo de vacunas eficaces que a su vez sean seguras y de fácil aplicación es difícil. Las vacunas de subunidades, preparadas a base de ADN, proteínas o péptidos, ofrecen una alternativa más segura, sin embargo, su eficacia protectora es baja por lo cual se requiere el uso de adyuvantes (Garcon *et al.*, 2012). Los adyuvantes son moléculas que se adicionan a un antígeno para potenciar su inmunogenicidad, se pueden clasificar en *inmunoestimulantes* tales como citocinas, lipopolisacárido (LPS), oligodeoxinucléotidos (CpG),  $\beta$ -glucanos y otros ligandos de receptores tipo Toll (TLRs) presentes en las células presentadoras de antígenos (CPAs), y en *vehículos* tales como las sales minerales, las emulsiones y los sistemas particulados (liposomas, complejos inmunes (ISCOMs), partículas tipo virus (VLPs) y nano y micropartículas poliméricas) que a su vez pueden ser diseñados como vehículos inmunoestimulantes (Reed *et al.*, 2009). Los sistemas particulados permiten el transporte del antígeno, retener su actividad y prevenir su degradación aun cuando son administrados por vías como la oral (Perrie *et al.*, 2008; Moreno & Rodríguez, 2016).

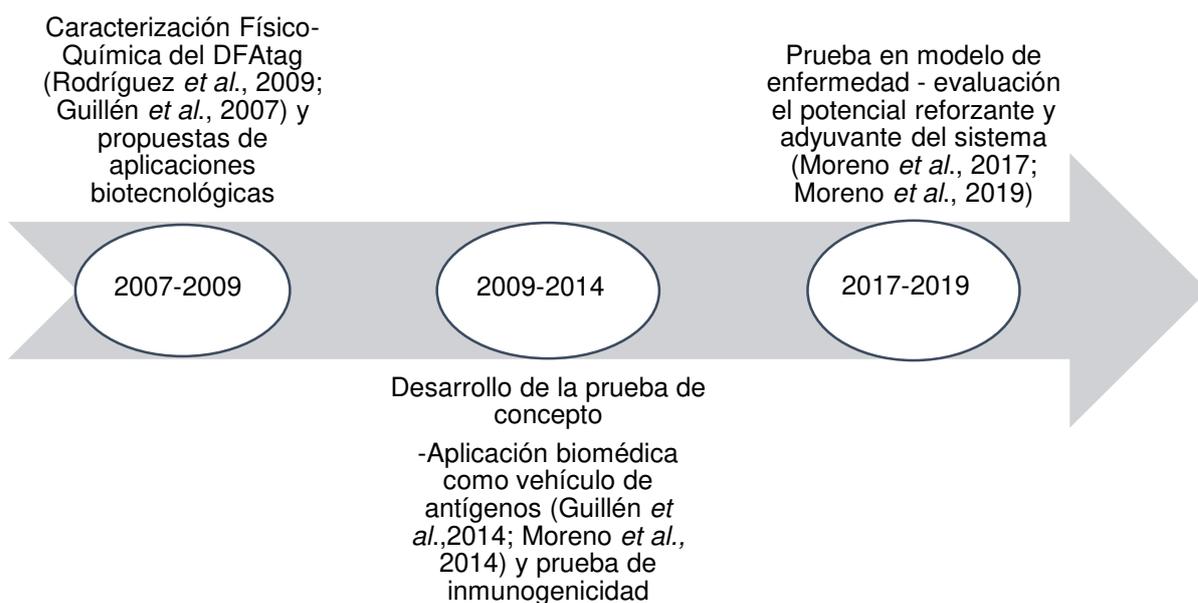
Recientemente en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM se desarrolló y patentó un vehículo de antígenos con propiedades adyuvantes preparado a base de almidón, ideal para la vacunación oral e intranasal (Rodríguez *et al.*, 2017; Guillén *et al.*, 2014; Moreno-Mendieta *et al.*, 2014). Este sistema consiste en micropartículas de almidón y un tallo proteico, que es un Dominio de Fijación al Almidón (DFAtag) que permite la inmovilización de los antígenos fusionados, denominado en lo sucesivo almidón-DFAtag-antígenos. El sistema se ha evaluado con varios antígenos provenientes de microorganismos patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* y *Clostridium tetani*, demostrándose en ratones que su administración oral o intranasal permite la llegada de los antígenos al tejido linfoide asociado a mucosas con la consecuente inducción de respuesta inmune específica (Guillén *et al.*, 2014; Moreno-Mendieta *et al.*, 2014).

Las principales características y ventajas de este sistema son su biodegradabilidad, biocompatibilidad, inocuidad y facilidad de preparación, las cuales se pretende conservar y aprovechar para el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas para vacunas. En el presente trabajo se propone desarrollar dos formas farmacéuticas para el sistema vacunal (almidón-DFAtag-antígenos) que garanticen la integridad estructural del mismo y conservar su actividad biológica para su administración oral e intranasal, así mismo se evaluará por primera vez su potencial inmunogénico en conejos raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) que no son genéticamente idénticos y que por su tamaño facilitan la administración de la vacuna por ambas vías.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Sistema Vacunal almidón-DFAtag-Antígenos**

El sistema vacunal almidón-DFAtag-Antígenos es un sistema integrado por dos componentes que consiste en micropartículas de almidón y un tallo de inmovilización no covalente de antígenos recombinantes. La etiqueta de inmovilización es una proteína diseñada a partir de un Dominio de Unión al Almidón (Rodríguez *et al.*, 2017) que tiene capacidad de unión específica al almidón insoluble, y que ha permitido el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas como la purificación de proteínas recombinantes directamente sobre el almidón o análogos (Guillén *et al.*, 2013) y el uso de las micropartículas de almidón como vehículo para la administración oral e intranasal de antígenos (Guillén *et al.*, 2014; Moreno-Mendieta *et al.*, 2014) (Figura 1).

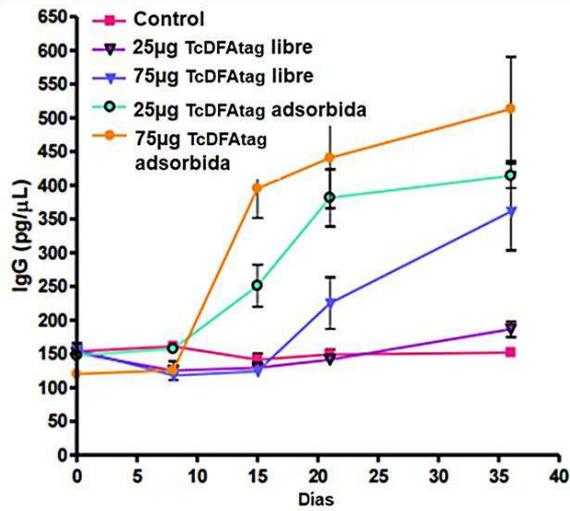


**Figura 1.** Línea del tiempo del desarrollo del sistema vacunal almidón-DFAtag-Antígenos, IIB-UNAM.

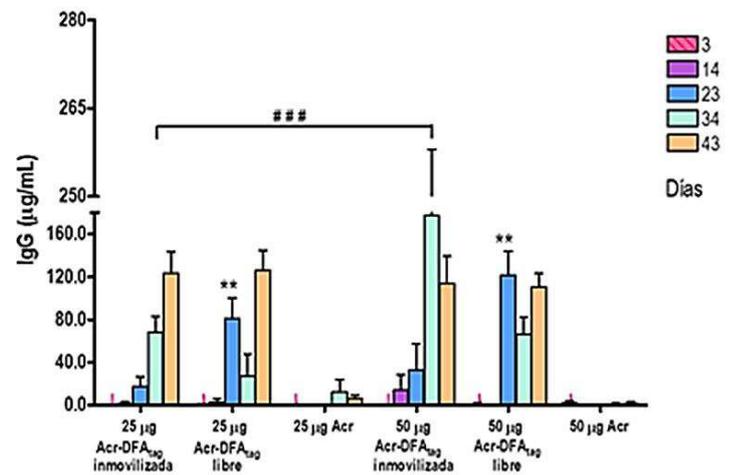
Se ha reportado que la inmovilización de proteínas o péptidos en micropartículas poliméricas permite su transporte y administración a través de mucosas para mantener la actividad y prevenir o retrasar su degradación enzimática (Pierre *et al.*, 2008). Por lo tanto, la utilidad del sistema almidón-DFAtag para transportar antígenos y su potencial adyuvante se evaluó en ratones sanos con proteínas de microorganismos que infectan por vía oral y nasal. Por una parte, el fragmento C de la toxina del tétanos (Tc) se fusionó con el DFAtag y se inmovilizó en micropartículas de almidón para su posterior administración por vía oral. Los resultados mostraron que la proteína recombinante (TcDFAtag) a dosis de 25 y 75  $\mu\text{g}$  indujo mayor producción de anticuerpos séricos IgG contra Tc, indicando que el sistema permitió el transporte del antígeno hasta los sitios de reconocimiento e inducción de respuesta inmune en mucosa intestinal (Guillén *et al.*, 2014) (Figura 2A). En otra aproximación, por vía nasal se administró la proteína alfa cristalina (Acr) de *M. tuberculosis*, también fusionada al DFAtag e inmovilizada en las micropartículas de almidón. Los resultados mostraron que por esta vía también era posible inducir respuesta sistémica de anticuerpos específicos hacia el antígeno Acr

y que con la fusión y la inmovilización se puede mejorar la respuesta al antígeno recombinante solo, que en las condiciones experimentales resultó pobremente inmunogénico (Moreno-Mendieta *et al.*, 2014) (Figura 2 B).

(A)



(B)



**Figura 2.** Anticuerpos IgG séricos (A) anti-Tc en ratones inmunizados por vía oral con 25 y 75  $\mu$ g de proteína TcDFAtag libre y adsorbida en almidón. (B) anti-Acr en ratones inmunizados por vía intranasal con 25 y 50  $\mu$ g de Acr y Acr-DFAtag libre y adsorbida en almidón. Imágenes tomadas con permiso de los autores (Guillén, 2014; Moreno-Mendieta, 2014).

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Vacunas

Las vacunas han sido una de las mejores estrategias para prevenir enfermedades infecciosas, repercutiendo favorablemente en la salud pública al evitar la muerte de millones de personas y erradicando enfermedades causadas por microorganismos patógenos a nivel mundial (Bastola *et al.*, 2017). De acuerdo con la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las vacunas son “cualquier preparado destinado a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos o inmunidad celular”.

El desarrollo de las vacunas comenzó con un enfoque empírico al no tener claro el mecanismo por el que se adquiría inmunidad a ciertas enfermedades infecciosas, sin embargo, los métodos de obtención de las vacunas fueron cambiando a través de los años junto con los conocimientos en el área de inmunología y microbiología, así como también con los avances tecnológicos (Morefield *et al.*, 2011). A mediados del siglo XIX Louis Pasteur desarrolló una técnica para atenuar a los microorganismos patógenos al someterlos a condiciones adversas (oxígeno o al calor), aunque la técnica mayormente empleada es la de pases continuos de microorganismos en medios de cultivo para obtener una cepa atenuada, esta fue desarrollada por Calmette y Güérin utilizando al microorganismo *Mycobacterium bovis* (Plotkin, 2014). El desarrollo de las vacunas se vio favorecido al poder inactivar bacterias enteras mediante calor o compuestos químicos, debido a que la inmunogenicidad se podía mantener si se realizaba adecuadamente el proceso, además de ser más seguras al no tener al microorganismo vivo con la posibilidad de una reversión de su virulencia (Plotkin, 2014). Una revolución sucedió a mediados del siglo XX al descubrir que las células podían cultivarse *in vitro* permitiendo la selección de mutantes de microorganismos atenuados, se comenzó un desarrollo racional de vacunas el cual se ligaba con el conocimiento acerca de la protección inmunológica mediada por anticuerpos (Plotkin & Plotkin, 2011). Con las continuas investigaciones se observó que muchos patógenos estaban rodeados por una

cápsula de polisacáridos y que los anticuerpos que respondían contra la cápsula promovían fagocitosis, sin embargo, no generaban respuesta inmunológica en lactantes por lo que se acoplaron a proteínas aumentando la respuesta inmune (Plotkin & Plotkin, 2011). Durante las décadas de 1970 y 1980 se introdujeron las vacunas formuladas con proteínas purificadas o polisacáridos capsulares, que ya no aportaban células o microorganismos completos, sino una pequeña parte de los mismos, suficiente para crear respuesta inmune frente a la enfermedad (Carrizo, 2008). Otra estrategia que cambió el desarrollo de las vacunas fue cuando se comenzó a implementar la ingeniería genética y permitió la producción de antígenos candidatos para vacunas en levaduras, bacterias, células de animales y de vegetales que producen un antígeno en cultivo, con el objetivo de hacer a los antígenos menos reactogénicos pero manteniendo su inmunogenicidad (Plotkin & Plotkin, 2011) como la vacuna contra la hepatitis B, autorizada en 1986 (Quevedo, 2008).

### **3.1.1 Clasificación de las vacunas**

Las vacunas se pueden clasificar en tres grandes grupos de acuerdo con la tecnología de producción del antígeno. El primer grupo son las vacunas vivas o atenuadas, en las cuales el patógeno se encuentra entero y debilitado mediante inoculaciones o siembras repetidas en medios de cultivos (tales como las vacunas contra la viruela, la fiebre amarilla, el sarampión, las paperas, la rubeola, la varicela). El segundo grupo incluye vacunas muertas o inactivadas a través de procesos físicos como calor o con compuestos químicos como formaldehído (como las vacunas contra difteria y el tétanos). El tercer grupo incluye las vacunas de subunidades y conjugadas las cuales utilizan una parte específica del microorganismo como una proteína o un carbohidrato capaz de estimular el sistema inmune (como la vacuna recombinante contra la hepatitis B, la vacuna de hidratos de carbono contra neumococo y la vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo B o meningococo) (Pulendran *et al.*, 2011).

### **3.1.1.1 Vacunas de Subunidades**

Las vacunas de subunidades contienen sólo las partes antigénicas del patógeno, las cuales provocan una respuesta inmune protectora. Se purifican a partir de microorganismos, se producen mediante técnicas de ADN recombinante o pueden ser péptidos sintetizados químicamente. Dentro de las vacunas de subunidad con licencia se encuentran la vacuna contra hepatitis B (VHB) aprobada por la FDA en 1986, la cual se desarrolló a partir de un sistema de expresión recombinante del antígeno de superficie (HBsAg) en células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Nelson *et al.*, 2013). Dos vacunas contra el virus de papiloma humano (VPH) se han autorizado Gardasil®/Silgard® aprobada en el 2006 y Cervarix® en el 2007, las cuales se elaboraron mediante tecnología recombinante obteniendo la proteína antigénica L1, la cual es parte de la cápside viral y es específica para cada tipo de VPH, se producen en células de levaduras o de insectos (Stillo *et al.*, 2015).

Las vacunas de subunidades reducen el riesgo de eventos adversos tales como reversiones espontáneas de vacunas atenuadas (como la vacuna contra polio que se ha relacionado con parálisis), invaginación intestinal (asociada con la vacuna contra el rotavirus) y la desnaturalización de péptidos antigénicos de vacunas inactivadas (Karch *et al.*, 2016). Sin embargo, las vacunas atenuadas tienen una mejor respuesta debido a que expresan múltiples antígenos, por lo cual para que una vacuna de subunidad sea igual de eficaz requiere el uso de adyuvantes que potencien la respuesta inmune (Karch *et al.*, 2016; De Temmerman *et al.*, 2011).

### **3.1.1.2 Adyuvantes y sistemas de entrega**

Los adyuvantes en las vacunas son macromoléculas que se usan para aumentar, acelerar y prolongar la respuesta inmune específica hacia los antígenos (EMEA/CHMP/VEG/134716/2004; Leroux-Roels, 2010). Con su inclusión en la formulación de una vacuna también se esperan otros beneficios como la inducción de memoria inmunológica, la reducción en la cantidad de antígeno utilizado y en el número de dosis administradas y la optimización de la respuesta en individuos

inmunológicamente inmaduros como neonatos y lactantes, inmunosuprimidos o ancianos (Garcon *et al.*, 2011). Se pueden utilizar diferentes criterios para agrupar los adyuvantes ya sea de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas, su origen y mecanismo de acción. De acuerdo con su mecanismo de acción, los adyuvantes se pueden dividir en *inmunoestimulantes* que activan a las células del sistema inmune innato a través de su unión a los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs por sus siglas en inglés) o directamente como en el caso de las citocinas, lipopolisacárido (LPS), oligodeoxinucleótidos (CpG),  $\beta$ -glucanos y otros ligandos de receptores tipo Toll (TLRs) presentes en las células presentadoras de antígenos (CPAs), y en *vehículos* o sistemas de entrega tales como las sales minerales, las emulsiones y los sistemas particulados (liposomas, complejos inmunes (ISCOMs), partículas tipo virus (VLPs) y nano y micropartículas poliméricas (Tabla 2) que a su vez pueden ser diseñados como vehículos inmunoestimulantes (Apostólico *et al.*, 2016; Reed *et al.*, 2009).

**Tabla 1.** Sistemas de entrega de antígeno

Grupo	Tipo	Ejemplos	Usos
Vehículos	Sales minerales	Sales de aluminio (fosfato e hidróxido de aluminio)	Vacunas contra hepatitis A (VHA), hepatitis B (VHB), difteria/tétanos/tos ferina (DTP), virus del papiloma humano (VPH), <i>Haemophilus influenza</i> tipo B (HiB) y neumococo (Apostólico <i>et al.</i> , 2016)
	Emulsiones	1) MF 59 es una emulsión de aceite en agua contiene escualeno 2) AS03 es una emulsión de aceite en agua contiene $\alpha$ -tocoferol, escualeno y polisorbato 80	1) Vacuna contra la gripa (Fluad™, Seqirus), también fue aprobado para la vacuna pandémica H1N1, vacuna contra VHB (Garcon <i>et al.</i> , 2011) 2) Su primer uso en humanos fue en la vacuna contra la malaria, de forma más reciente se ha utilizado en vacunas contra la influenza (Apostólico <i>et al.</i> , 2016)
	Sistemas particulados	1) Liposomas 2) Virusomas 3) Complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) 4) Partículas similares a virus (VLP) 5) Nano y micropartículas	1) Sin licencia 2) Actualmente hay cinco vacunas con licencia: Inflexal V, Nasalfu e Invivac para influenza y Epaxal para hepatitis A (Apostólico <i>et al.</i> , 2016) 3) Diversos estudios se han realizado para el uso de ISCOM en humanos sin embargo, solo están aprobados para uso veterinario (Bobbala <i>et al.</i> , 2016). 4) Hay pocas vacunas disponibles que contengan dentro su formulación VLPs incluyen Engerix/ Recombivax (Hepatitis B), Cervarix/ Gardasil (HPV), y Mosquirix (Malaria) (Apostólico <i>et al.</i> , 2016) 5) Sin licencia

Dentro de los sistemas de entrega de antígenos se encuentran los sistemas particulados, los cuales se han estudiado como portadores de antígenos debido a que: 1) imitan la naturaleza particulada de los patógenos, así como su tamaño que va de nano a micrómetros por lo que facilita el reconocimiento y captación por parte de las células presentadoras de antígenos (CPAs), las cuales generalmente internalizan a través de fagocitosis a los patógenos de 0.5-10  $\mu\text{m}$  de tamaño induciendo una mejor respuesta en comparación con los antígenos solubles; 2) protegen de la degradación de enzimas proteolíticas; 3) tienen la capacidad de estimular la presentación cruzada, permitiendo la presentación de los antígenos extracelulares tanto en complejo principal de histocompatibilidad (CPH) clase I como de clase II para la posterior inducción de respuestas efectoras de linfocitos tanto CD8+ como CD4+ (De Temmerman *et al.*, 2011; Bobbala & Hook, 2016). Estos sistemas también ofrecen la posibilidad de entregar a las CPAs cantidades relativamente grandes de antígenos en simultáneo con moléculas inmunoestimulantes, ya que ambos pueden estar asociados a las partículas o las partículas ser inmunoestimulantes *per se* (De Temmerman *et al.*, 2011).

Las nano y micropartículas poliméricas se han estudiado por su potencial como portadoras de vacunas. Además de tener características como ser biodegradables y biocompatibles, se pueden preparar a partir de una amplia variedad de polímeros naturales, sintéticos y copolímeros que les confieren diversas formas, tamaño y carga superficial (Vartak & Sucheck, 2016). Entre los polímeros sintéticos investigados como adyuvantes en vacunas se encuentran: poli (lactida-co-glicolida) (PLG), ácido (poliláctico) (PLA), ácido(poliláctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliglutámico, polietilenglicol y poliestireno. También se han estudiado los polímeros naturales como el quitosano, inulina, pululano, alginato (Zhao *et al.*, 2014), almidón (Guillén *et al.*, 2014 & Moreno-Mendieta *et al.*, 2014) y copolímeros como el almidón con ácido poliacrílico (Coucke *et al.*, 2009). Los estudios también han demostrado, que las micropartículas del tamaño de 10–100  $\mu\text{m}$  ejercen su efecto adyuvante mediante la formación de depósitos que consiste en la unión (ya sea que se atrapen,

adsorban o agreguen) con antígenos, liberándolos lentamente durante un largo periodo de tiempo, mientras que las nanopartículas y las micropartículas pequeñas (50 nm a 10µm) son fácilmente captadas por las CPAs (Bobbala & Hook, 2016)

### **3.1.2 Vías de administración de las vacunas**

La vía de administración comúnmente empleada para las vacunas es la parenteral aplicadas a nivel intramuscular (como la vacuna contra hepatitis B), subcutánea (como la vacuna contra sarampión, rubéola y paperas) e intradérmica (como la vacuna contra tuberculosis) (Moreno, 2010). La administración más frecuentemente aplicada de las parenterales es a nivel intramuscular debido a que hay una mejor vascularización del músculo en comparación con el tejido subcutáneo e intradérmico, esta ruta se ha usado para administrar vacunas en esquemas de una dosis primaria seguida de dosis de refuerzo administradas por una ruta diferente. La ruta subcutánea se ha utilizado especialmente para vacunas atenuadas, debido a que por esta vía se pueden inyectar grandes volúmenes y el dolor es menor comparado con la inmunización intradérmica. Sin embargo, a nivel intradérmico la actividad de las vacunas se ve favorecida debido a que en esta capa de la piel se encuentran mastocitos y células inmunes de Langerhans (Bobbala *et al.*, 2016). Las vacunas también se administran por vía mucosa oral (como la vacuna contra rotavirus) o por vía mucosa nasal (como la vacuna contra influenza) (Moreno, 2010).

#### **3.1.2.1 Vacunas mucosales**

La inmunización vía mucosas oral y nasal es una alternativa a la inmunización parenteral, ya que permite estimular al sistema inmune a nivel sistémico y local de forma simultánea, gracias a la organización y características que presenta el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) (Pawar *et al.*, 2013). El MALT está conformado por el tejido linfoide asociado a nariz (NALT), el tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), el tejido linfoide asociado a intestino (GALT) y el tejido linfoide asociado al tracto genitourinario (GENALT), los cuales son sitios que inducen la respuesta inmune debido a que están cubiertos por epitelio especializado denominado epitelio

folicular asociado (FAE), que contiene células membranosas (M) y células dendríticas (CDs) responsables de la captura, transporte y procesamiento de antígenos, las células dendríticas activadas drenan de la mucosa a los ganglios linfáticos y al bazo conduciendo a la estimulación de una respuesta inmune sistémica (Tabla 2) (Lycke, 2012).

**Tabla 2.** Organización del tejido linfoide asociado a mucosas (Lycke, 2012)

Sistema linfático e inmunitario				Característica
Medula ósea y timo				Tejido linfoide primarios
Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)				Tejido linfoide secundario
Tejido linfoide asociado al intestino (GALT)	Tejido linfoide asociado a nariz (NALT)	Tejido linfoide asociado a bronquios (BALT)	Tejido linfoide asociado a tracto genitourinario (GENALT)	Tejido linfoide organizado (folículos). Sitio inductor
Lámina propia de la mucosa				Tejido linfoide difuso. Sitio efector

La organización de este tejido determina el diseño de la vacuna o fármaco para administrar por mucosas ya que es diferente del resto del sistema inmune.

Sin embargo, hay una serie de barreras que superar para inmunizar vía mucosas, en el caso de la vía oral son las condiciones del tracto gastrointestinal (pH, enzimas) que pueden degradar al antígeno, también la predisposición del GALT a ser tolerogénico o hiporeactivo así como la baja permeabilidad del epitelio intestinal para macromoléculas biológicas. En el caso de la inmunización nasal, el aclaramiento mucociliar limita la absorción eficiente del antígeno por la mucosa nasal y la adecuada presentación del antígeno al NALT, el cual tiene el potencial de inducir respuestas inmunes humorales y celulares (Kharenko *et al.*, 2009).

Entre las ventajas que la inmunización vía mucosa tiene, esta su fácil administración, lo que permite prescindir de personal calificado, además de evitar la contaminación cruzada por el uso de agujas, también resulta eficaz para brindar comodidad a los usuarios y el apego a los esquemas de vacunación (Davitt & Lavelle 2017). La primera inmunización a través de la superficie mucosa se realizó con poliovirus atenuado en 1962 (Apostólico *et al.*, 2016). Actualmente hay siete vacunas no parenterales aprobadas por FDA, cinco son de administración oral (vacunas contra poliomielitis, adenovirus, cólera, rotavirus y tifoidea) y dos son vacunas líquidas para administración intranasal (ambas vacunas contra influenza) (Bahamondez-Canas *et al.*,2018). En la tabla 3 se muestran algunas de las formulaciones de vacunas mucosales comercialmente disponibles.

**Tabla 3.** Formulaciones de vacunas mucosales comercialmente disponibles (Tlaxca, 2014).

Vacuna	Vacuna Vía Oral					Vacuna Vía Nasal
Componentes de la formulación	Polio Sabin™ Virus atenuado	Rotavirus(RotaTeQ®) Virus atenuado	Colera (Dukoral®) Bacteria inactivada	Salmonella typhi (Vivotif®) Bacteria atenuada	Adenovirus Virus atenuado	Contra Influenza (Flumist®) Virus atenuado
Estabilizador	Cloruro de magnesio, polisorbato 80, Arginina	Suero fetal bovino, sacarosa, citrato de sodio, fosfato de sodio ácido dihidratado, hidróxido de sodio, polisorbato 80	Suspensión oral: Fosfato de sodio ácido dihidratado, fosfato de sodio básico dihidrato, Cloruro de sodio	Sacarosa, ácido ascórbico, hidrolizado ácido de caseína, lactosa anhidra	Liofilizado: glutamato monosódico, sacarosa, D-manosa, D-fructosa, dextrosa, albúmina sérica humana, fosfato de potasio y pladsona C	Glutamato monosodico, gelatina hidrolizada porcina, arginina, sacarosa, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico
Agentes antimicrobianos	Sulfato de neomicina Sulfato de polimixina B	-----	-----	-----	-----	Gentamicina
Otros excipientes	-----	-----	Granulado para suspensión oral en sobre: Bicarbonato de sodio, Carbonato de sodio anhidro, Ácido cítrico, Citrato de sodio (Agente efervescente)  Sacarina sódica (edulcorante)  Aroma de frambuesa	Estearato de magnesio  Cápsula: Gelatina, Dióxido de titanio, Óxido de hierro amarillo, Óxido de hierro rojo, Eritrosina.  Recubrimiento de la cápsula: Ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa,, Dietilftalato, Etilenglicol	Tableta: lactosa, celulosa microcristalina, polacrilina de potasio, estearato de magnesio  Recubrimiento entérico que consiste en acetato de celulosa ftalato, alcohol, acetona y aceite de ricino.  La tableta Tipo 7 también contiene amarillo #6.	-----
Forma farmacéutica	Suspensión oral (GlaxoSmithK)	Solución oral (Merck)	Granulado efervescente para suspensión oral (Valneva)	Liofilizado en Cápsulas de recubrimiento entérico (PaxVax)	Dos tabletas: una tableta de Adenovirus Tipo 4 y una tableta de Adenovirus tipo 7 (Teva Pharmaceuticals USA, Inc)	Spray intranasal (AstraZeneca)

### 3.1.3 Formulación de vacunas

Las vacunas dentro de sus formulaciones contienen un componente activo (dosis antigénicas derivadas de microorganismos, sus toxinas o ambos), además están compuestas de otras sustancias como adyuvantes, estabilizantes, conservadores, antibióticos y trazas de medio de cultivo utilizados en la preparación de la vacuna (Caubet *et al.*, 2014) (Tabla 4). Los componentes que conforman la formulación de la vacuna dependen del tipo de antígeno (Tabla 5).

**Tabla 4.** Componentes generales para las formulaciones de las vacunas (Adaptada de Chung *et al.*, 2013; Caubet *et al.*, 2014).

Componente	Tipo	
Antígenos inmunizantes	Microorganismos vivos o atenuados, muertos o inactivos, toxoides, proteína recombinante	
Medios de cultivo (proteínas / péptidos)	Huevo de gallina, suero de caballo, murino y células de simio, células de riñón de perro, levadura	
Aditivos	Antibióticos	Neomicina, clortetraciclina, gentamicina, estreptomycin, eritromicina, kanamicina, polimixina B, anfotericina B
	Conservador	Timerosal, 2-fenoxietanol, fenol, cloruro de bencetonio
	Estabilizadores	Gelatina, albúmina de suero humano, mezcla de aminoácidos, glutamato, glicina, glutamato monosódico, sacarosa, lactosa, sorbitol, ácido ascórbico, fosfato, polisorbato 80/20, polilínea
	Adyuvantes	Sales de aluminio, MF-59, ASO4 (Monofosforil lípido desacilado A +hidróxido de aluminio)

**Tabla 5.** Componentes generales de la formulación de acuerdo al tipo de vacuna (Tlaxca, 2014)

Componentes de la formulación	Vacuna atenuada	Vacuna inactiva	Vacuna conjugada	Vacuna de subunidad
Antígeno	Contra Sarampión (Attenuvax®)	Contra la difteria, el tétanos y la tos ferina (DTP)(ADACEL®)	Vacuna antimeningocócica (VA-MENGOC-BC®)	Vacuna VHB (Engerix-B®)
Adyuvante	-----	Fosfato de aluminio	Hidróxido de aluminio	Hidróxido de aluminio
Estabilizador	Gelatina, sorbitol, fosfato de sodio, sacarosa, suero bovino fetal, albúmina de suero humano	-----	Fosfatos	-----
Conservador	-----	2-fenoxietanol	Tiomersal	2-fenoxietanol
Agentes antimicrobianos	Neomicina	-----	-----	-----
Forma farmacéutica	Liofilizado estéril (Merck)	Suspensión inyectable (Sanofi pasteur)	Suspensión inyectable (Laboratorio Delta)	Suspensión para inyección (GlaxoSmithKline)

### 3.1.3.1. Formulación de vacunas atenuadas

En las vacunas atenuadas el microorganismo patógeno se encuentra reducido en su virulencia, por lo que dentro del huésped provocan una respuesta inmune que imita la infección natural (Plotkin & Plotkin, 2011). La atenuación del patógeno se realiza mediante: a) cultivo del patógeno en condiciones poco favorables como bajas temperaturas, este proceso permite la selección de cepas que mutan para adaptarse al medio favoreciendo su crecimiento pero perdiendo virulencia, b) introduciéndolos en una especie diferente a la que infecta es decir, usar un virus animal para inmunización en humanos, c) otra técnica usualmente utilizada para atenuar virus es forzarlos a replicarse rápidamente en pases continuos en cultivos de tejidos (la vacuna contra la influenza se prepara realizando pases en huevos embrionados de pollo y en la vacuna original de Sabin contra polio se realizaron los pases del virus en células epiteliales de riñón de mono) (Mak & Saunders, 2006).

Las vacunas atenuadas generan una fuerte respuesta inmune humoral y celular, además de una respuesta a largo plazo y resisten al pH ácido y enzimas del estómago (Tlaxca, 2014).

Para la formulación de vacunas atenuadas se deben tener varias consideraciones, al generar una fuerte respuesta inmunológica no requiere de adyuvantes, también se deben tomar en cuenta factores que afectan la estabilidad o eficacia del patógeno como lo es: temperatura, pH y deshidratación (Tlaxca, 2014). La inestabilidad puede implicar vías físicas y químicas de degradación, por lo que el uso de estabilizantes es fundamental, usualmente se utilizan disacáridos (sacarosa y lactosa) como crioprotectores (Caubet *et al.*, 2014). Para mantener un pH óptimo se utilizan amortiguadores, debido a que la mayoría de las vacunas virales y bacterianas deben de estar en un rango de 5.5 a 8, por lo que se deben incluir histidinas, succinato, citrato, fosfato y tris (Tlaxca, 2014). En las vacunas también se utilizan agentes modificadores de la viscosidad (polímeros, sales y gelatina) y los tensoactivos que actúan como agentes humectantes evitando la deshidratación y reduciendo así la precipitación y la degradación, además de facilitar la absorción (Tlaxca, 2014). Los agentes antimicrobianos se utilizan para evitar la contaminación durante el proceso de fabricación, diversas vacunas contienen gentamicina, tetraciclina, neomicina, estreptomycinina y polimixina entre otras, la mayoría son eliminados durante el proceso de purificación, sin embargo, pueden estar presentes trazas en las vacunas (Caubet *et al.*, 2014)

### **3.1.3.2 Formulación de vacunas inactivas, conjugadas y de subunidad**

Las vacunas inactivas pueden consistir en agentes completos (como la vacuna inactivada contra la poliomielitis de Salk) o en componentes específicos derivados del patógeno (toxoides que son toxinas inactivadas). El patógeno se inactiva por tratamiento con calor, radiación o con un agente químico como el formaldehído. Con la realización correcta de estos procedimientos se mantiene la estructura de los

epítomos (parte del microorganismo que será reconocida por un anticuerpo específico), pero se eliminan la capacidad del patógeno para replicarse o recuperar virulencia (Tak *et al.*, 2014). Las vacunas de polisacáridos como las vacunas contra el meningococo y el neumococo se purifican físicamente de las cápsulas bacterianas, y se acoplan con proteínas para mejorar su inmunogenicidad (Subodh, 2018). Las vacunas de subunidad contienen un antígeno purificado en lugar de utilizar al microorganismo completo, se producen mediante técnicas de ADN recombinante, en la cual los genes que codifican la proteína antigénica se insertan en un vector (virus o bacterias) para la expresión del antígeno (Vartak & Sucheck, 2016).

Las vacunas inactivas, conjugadas y de subunidad, no generan una respuesta inmune tan fuerte como las atenuadas, por lo que requieren dentro de su formulación, adyuvantes como las sales de aluminio que se encuentran en la vacuna contra difteria, tétanos y tos ferina (ADACEL<sup>®</sup>), vacuna antimeningocócica (VAMENGOC-BC<sup>®</sup>) y la vacuna contra el virus de Hepatitis B (Engerix-B<sup>®</sup>). Otros adyuvantes que se utilizan para vacunas son las emulsiones MF59 compuestas de aceite de escualeno, polisorbato 80 y ésteres de sorbitano 20 en la vacuna contra influenza (Fluad<sup>®</sup>), AS03 compuesta de  $\alpha$ -tocoferol, escualeno y polisorbato 80 en la vacuna contra la influenza (Pandemrix<sup>®</sup>) y AS04 compuesta de monofosforil lípido A y alumbre en la vacuna contra el virus de papiloma humano (Cervarix<sup>®</sup>). También requieren de conservadores que se adicionan a la formulación para evitar su descomposición o formación de un contaminante de tipo biológico que podrían introducirse durante el uso repetido de los viales multidosis. Las vacunas inactivas, conjugadas y de subunidad al no generar la misma respuesta inmunológica que una atenuada requieren de dosis de refuerzos, por lo que los conservadores en la formulación son necesarios, entre los más utilizados se encuentran 2-fenoxietanol, timerosal y fenol. Al igual que las vacunas atenuadas, estas vacunas requieren de un pH óptimo para mantener la estabilidad del antígeno, por lo que también se emplean amortiguadores que incluyan histidinas, succinato, citrato, fosfato y tris (Tlaxca, 2014).

### 3.1.4 Formas farmacéuticas de las vacunas

Las vacunas se encuentran en formas farmacéuticas en estado líquido (suspensiones y soluciones) y en estado sólido (liofilizadas, cápsula, tableta, gránulo efervescente) (Tlaxca *et al.*, 2014) (Tabla 6). De las vacunas administradas por vía parenteral la mayoría son suspensiones para inyectar, ya sea que se suspenda el liofilizado antes de administrarse o se encuentre en suspensión lista para administrarse (Moreno, 2010). Las formas farmacéuticas líquidas tienen un reto mayor de estabilidad debido a que los procesos de degradación en este medio se ven favorecidos (Tlaxca *et al.*, 2014). Las formas farmacéuticas sólidas, son más estables debido a que se reduce la movilidad de las macromoléculas y se eliminan las vías de degradación por hidrólisis (Sheena *et al.*, 2012). Independientemente de la forma farmacéutica y de la estabilidad de ésta, las vacunas para su almacenamiento y distribución requieren de la red de cadena fría (Tlaxca *et al.*, 2014).

**Tabla 6.** Forma farmacéutica de las vacunas comerciales (Tlaxca, 2014)

Estado de la vacuna	Forma farmacéutica	Vacuna
Sólida	Liofilizado	Vacuna BCG (Birmex)
		<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (Act-HIB®)
		Vacuna contra Sarampión (Attenuvax®)
	Liofilizado en cápsulas	Vacuna contra <i>Salmonella typhi</i> (Vivotif®)
	Tableta con recubrimiento entérico	Vacuna contra adenovirus
Líquidas	Suspensión	Vacuna contra hepatitis B (Engerix-B®)
		Vacuna antineumocócica (Prevenar13®)
		Vacuna antimeningocócica (VA-MENGOC-BR®)
		Vacuna contra difteria, tétanos y tos ferina (ADACEL®)
		Vacuna contra el virus de papiloma humano (Cervarix®)
Solución	Vacuna contra polio de Sabin™	
	Solución	Vacuna contra rotavirus (RotaTeq®)
	Spray	Vacuna contra influenza (Flumist®)

### **3.2. Formas farmacéuticas para la administración de vacunas mucosales**

El principal desafío al desarrollar una vacuna es que ésta sea eficaz (capacidad de generar inmunidad a largo plazo), segura (en sí misma no debe provocar la enfermedad, ni en autoinmunidad o hipersensibilidad) y estable (Tlaxca, 2014; Vartak & Sucheck, 2016). Dentro de la formulación de la vacuna se debe tener en cuenta la facilidad de administración, por lo que al elegir la vía de administración se deben de tomar en cuenta factores anatómicos (como el grosor de la piel si la vía es parenteral) y fisiológicos, tales como localización de ganglios linfáticos drenantes, la vascularización y la presencia o ausencia de subconjuntos de células inmunes. También se debe considerar la naturaleza del antígeno (atenuado, inactivo, conjugado o de subunidad) y del adyuvante (vehículo o inmunoestimulante) en caso de ser necesario y de la respuesta inmune requerida (humoral, celular o ambas) con el objetivo de obtener una vacuna eficaz y segura (Bobbala & Hook, 2016).

Como se planteó anteriormente, la inmunización por mucosas por vía oral y nasal en comparación con la parenteral es más fácil de administrar, indolora y estimula la inmunidad local y sistémica debido a la presencia del MALT (Pawar *et al.*, 2013; Davitt & Lavalle, 2017). En el sistema vacunal almidón-DFAtag-antígenos, el almidón actúa como vehículo al transportar y estabilizar al antígeno para mantener su actividad. Este sistema vacunal ya se ha probado con diferentes antígenos fusionados, que de este modo fueron capaces de inducir respuesta inmune específica en ratones sanos, después de la inmunización por mucosas tanto por vía oral como nasal (Guillén *et al.*, 2014; Moreno-Mendieta *et al.*, 2014), por lo que un diseño de formas farmacéuticas óptimo permitirá mantener la actividad del antígeno y una fácil administración. La inmunización por mucosas tanto por vía oral como nasal requiere superar barreras biológicas, por lo que en el diseño de una formulación adecuada es necesario ajustar los excipientes dependiendo de la vía mucosal (Kharenko *et al.*, 2009).

El almidón es un excipiente que al encontrarse en forma sólida proporciona mayor estabilidad a la vacuna, además de que puede emplearse en formulaciones de formas farmacéuticas como comprimidos con recubrimiento pelicular entérico para evitar la degradación del antígeno por el pH del estómago y asegurando su llegada al intestino delgado. También para la administración por vía nasal puede mantenerse en polvo hasta el momento de administrarse en suspensión en un mucoadhesivo.

### **3.2.1 Forma farmacéutica: Comprimidos**

Una forma farmacéutica es la mezcla de uno o varios principios activos y excipientes que facilita la fabricación, dosificación, administración y conservación de un medicamento. En general las formas de dosificación son sólidas (tabletas, cápsulas), líquidas (como jarabes), semisólidas (cremas, ungüentos, pomadas), y se administran por diferentes vías como oral, rectal, vaginal, tópica, oftálmica, ótica, parenteral e inhalatoria (Narayan, 2011).

Los comprimidos son formas farmacéuticas sólidas de dosificación unitaria obtenidos mediante tres métodos generales: granulación húmeda, granulación seca y el de compresión directa (García & Santos, 2001). Dentro de la vía oral los comprimidos son la forma farmacéutica más empleada debido a sus ventajas como: facilidad de administración, precisión en la dosificación, presentan una mayor estabilidad química debido a la ausencia de agua y un bajo costo ya que la producción a gran escala permite obtener elevados rendimientos (García & Santos, 2001; Nagar *et al.*, 2011).

Los comprimidos de acuerdo con su presentación y forma de administrarse se pueden clasificar en: comprimidos orales para ingestión (convencionales, masticables, multicapa y recubiertos), comprimidos que se mantienen en la cavidad oral (bucales y sublinguales), comprimidos administrados por otras vías (vaginales

y de implantación subcutánea) y en comprimidos destinados a dispersarse antes de la administración (efervescentes, solubles y dispersables) (García & Santos, 2001).

Dentro de la elaboración de cualquier tipo de comprimido, se requiere de un principio activo con actividad farmacológica y de excipientes, los cuales se adicionan a la formulación para facilitar el proceso de fabricación y que también mejoren las características físicas como el color, el sabor, la desintegración y la liberación del fármaco (Rudnic & Schwartz, 2000).

### **3.2.2 Formulación de comprimidos**

Los excipientes que se encuentran dentro de una formulación aportan diferentes características al comprimido. De acuerdo con su función son:

*Diluyente.* El cual proporciona volumen y tamaño adecuado al comprimido para su manejo y fabricación, como lactosa monohidratada, lactosa anhidra, celulosa microcristalina, almidón parcialmente pregelatinizado, manitol, fosfato de calcio dibásico entre otros (García & Santos, 2001).

*Disgregante.* El cual contrarresta las fuerzas internas de cohesión del comprimido para facilitar la liberación del principio activo, como celulosa microcristalina, hidroxipropilcelulosa, croscarmelosa sódica, almidón parcialmente pregelatinizado, crospovidona entre otros (García & Santos, 2001).

*Aglutinante.* Actúa como aglomerante uniendo las partículas entre sí cuando estas no se mantienen unidas por efecto de la presión únicamente, ejemplos son sacarosa, almidón, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona entre otros (García & Santos, 2001).

*Deslizante.* El cual mejora la fluidez de polvos y gránulos, como dióxido de silicio coloidal (García & Santos, 2001).

*Lubricante.* Disminuye la fricción por contacto entre la mezcla de polvos o granulados y las paredes metálicas de los equipos de producción, como talco,

estearato de magnesio, estearato de calcio, lauril sulfato sódico entre otros (García & Santos, 2001).

*Antiadherentes.* Evitan la adherencia de los gránulos a los punzones y a la matriz, como talco y almidón de maíz, estearatos metálicos entre otros (García & Santos, 2001).

*Colorantes y saborizantes.* Los cuales se incorporan a la formulación para mejorar el aspecto y sabor del comprimido, como el óxido de hierro, lactosa, manitol entre otros (García & Santos, 2001).

La selección de un excipiente dentro de la formulación para un comprimido depende de su compatibilidad con el principio activo, de su función tecnológica, del proceso mediante el cual se fabrique el comprimido y de la forma como se va administrar (Rudnic & Schwartz, 2000).

### **3.2.3 Proceso de fabricación de comprimidos**

Los comprimidos se obtienen mediante tres métodos generales:

*Granulación húmeda.* En este proceso se obtienen gránulos y las fases que involucran son: humectación del polvo mezclado, granulación del polvo mezclado, secado del granulado y doble tamizado. En la fase de humectación se adiciona una solución líquida que contiene un aglutinante a los polvos para formar gránulos. La formación de gránulos tiene como objetivo mejorar las propiedades de flujo y evitar segregación del principio activo y los excipientes. En la fase de secado se extrae el líquido utilizado para la humectación, para posteriormente pasar al proceso de tamizado para obtener el tamaño de gránulo deseado (García & Santos, 2001).

*Granulación seca.* Cuando los componentes del comprimido son higroscópicos o no soportan las temperaturas altas durante el secado y además tienen propiedades cohesivas, se elige la vía seca para formar gránulos. El proceso consiste en dos etapas, la primera es una compresión y la segunda la formación del gránulo. En este proceso los polvos se agregan sometidos a presión obteniendo un comprimido

que posteriormente se fractura para tamizarlo y unificar su tamaño de partícula (García & Santos, 2001).

*Compresión directa.* El proceso consiste en mezclar los polvos, sin la necesidad de elaborar gránulos, es importante que tanto el principio activo como los excipientes cuenten con propiedades de flujo y compresibilidad (García & Santos, 2001).

### **3.2.3.1 Compresión directa**

Es el proceso más simple, que consiste en realizar una mezcla simple en un mezclador de polvos, los cuales poseen propiedades de fluidez y compresibilidad para poder formar un comprimido sin tratamiento previo. Debido a que el número de pasos del proceso son mínimos y a que se ocupan máquinas de compresión convencionales, se reducen los costos por lo que es un proceso muy rentable (Rudnic & Schwartz, 2000).

Entre los excipientes más utilizados en la compresión directa se encuentran la lactosa monohidratada, lactosa anhidra, el manitol, el sorbitol, celulosa microcristalina y los almidones. Estos excipientes tienen diferentes características y mientras unos presentan propiedades óptimas de flujo (como lactosa y manitol), otros presentan mejores propiedades de compresibilidad (como celulosa microcristalina) proporcionando una dureza adecuada al comprimido, por lo que es necesario mezclar los excipientes con el objetivo de mejorar las características individuales para obtener un comprimido con buenas propiedades mecánicas y biofarmacéuticas (García & Santos, 2001).

Para principios activos higroscópicos y termolábiles, es un proceso adecuado debido a que no se somete a ningún tipo de estrés mecánico o físico, al no someterlos a granulación ni a estar en contacto con líquidos (Rudnic & Schwartz, 2000).

### **3.2.4 Recubrimiento de comprimidos**

El recubrimiento de comprimidos es una estrategia útil que se utiliza por diferentes razones que van desde las estéticas hasta controlar la biodisponibilidad del fármaco. Para aplicar cubiertas a formas farmacéuticas sólidas hay cuatro técnicas principalmente:

*Recubrimiento con azúcar.* Es el método más antiguo para revestir comprimidos, consiste en la aplicación continua de capas de una solución acuosa que en su mayor parte contiene sacarosa, utilizando bombos de gragear o pailas, y obteniendo un incremento en peso del núcleo de un 30 a un 100%. Este procesamiento consta de varias etapas, cuya duración va de horas a días (Porter, 2000).

*Recubrimiento por compresión.* Mediante máquinas de comprimir especiales, se compacta un recubrimiento seco alrededor del núcleo del comprimido producido por la misma máquina. La ventaja principal de este tipo de recubrimiento es que se eliminan disolventes tanto acuosos como orgánicos. Sin embargo, este proceso es mecánicamente complejo, por lo que no es muy utilizado (Porter, 2000).

*Recubrimiento con película.* Consiste en la deposición por atomización de una fina película de polímero al núcleo del comprimido. La formulación del líquido de recubrimiento incluye un agente filmógeno (polímero), disolvente (orgánico o acuoso), plastificante (por ejemplo, polietilenglicol, propilenglicol, glicerol) y colorante. La cantidad de polímero controla el aumento en peso de las formas recubiertas respecto a los núcleos iniciales de partida, y dependen de la función que se desee dar a la películas de recubrimiento ya sea estético, entérico o de liberación controlada (Porter, 2000)

#### **3.2.4.1 Recubrimiento pelicular entérico**

El recubrimiento pelicular entérico consiste en la deposición de una capa delgada, de una formulación polimérica sobre la superficie de una forma de dosificación sólida oral, protegiendo al fármaco del pH del estómago (Naser *et al.*, 2012). Esta

propiedad se debe a que los revestimientos de polímeros resistentes a los ácidos se disuelven a partir de un pH específico, por ejemplo, a partir del pH 5.5, para que el fármaco comience a liberarse en el intestino delgado. Entre los polímeros utilizados para el recubrimiento entérico se encuentra la goma de laca, polimetacrilatos, acetato ftalato de celulosa y acetato ftalato de polivinilo (Ahmad *et al.*, 2016).

### **3.2.2 Formulaciones nasales**

La administración por vía intranasal de un fármaco es una alternativa a la ruta oral y parenteral. La administración localizada de fármacos nasales como corticosteroides, antihistamínicos, anticolinérgicos y vasoconstrictores se usa generalmente para tratar afecciones relacionadas con la cavidad nasal, como congestión, rinitis o sinusitis. Se utilizan diferentes formulaciones que incluyen aerosol nasal, gota nasal, polvo nasal y geles nasales. Las ventajas de administración de fármacos a través de la nariz son: 1) una rápida absorción del principio activo, 2) se evita el metabolismo hepático de primer paso, 3) las formas de dosificación suelen ser fáciles de usar, indoloras y no invasivas y 4) autoadministrables propiciando el apego al tratamiento por parte del paciente (Woensel, 2013). Existen varios tipos de excipientes utilizados en formulaciones nasales. Los excipientes comúnmente utilizados y añadidos con frecuencia son los siguientes:

*Amortiguadores.* El pH se debe ajustar al fisiológico (4.5 y 6.5) para evitar irritación de la mucosa nasal e infecciones, ya que las lisozimas que se encuentran en las secreciones nasales y que son responsables de la destrucción bacteriana se inactivan en condiciones alcalinas. Por lo que los amortiguadores que más se utilizan contienen fosfato de sodio, citrato de sodio y ácido cítrico. La elección del amortiguador también se debe ajustar a la solubilidad y a la estabilidad del fármaco (Pujara *et al.*, 1995)

*Soluciones isotónicas.* Las soluciones ligeramente hipertónicas e isotónicas causan mínimos daños en la mucosa nasal, mientras que las soluciones hipotónicas le causan daño irreversible. También la tonicidad puede afectar la absorción de los fármacos, dentro de los compuestos utilizados para ajustar la tonicidad de la formulación se encuentran el cloruro de sodio y la dextrosa (Kushwaha *et al.*, 2011).

*Cosolventes.* La solubilidad acuosa de los fármacos es una limitación para su administración nasal, por lo que el uso de disolventes ayuda a mejorar la solubilidad, se utilizan comúnmente alcohol, propilenglicol, etilenglicol, también se pueden usar otros compuestos como tensoactivos o ciclodextrinas (Kushwaha *et al.*, 2011).

*Conservadores.* La mayoría de las formulaciones nasales son de base acuosa, por lo que se necesitan conservadores para prevenir el crecimiento microbiano (por ejemplo, parabenos, feniletanol, cloruro de benzalconio o ácido benzoico) (Pujara *et al.*, 1995).

*Antioxidantes.* Se puede requerir una pequeña cantidad de antioxidantes para prevenir la oxidación del fármaco (sulfito de sodio, hidroxitolueno butilado, metabisulfito de sodio, tocoferol). Usualmente los antioxidantes no afectan la absorción del fármaco, pero pueden causar irritación nasal (Kushwaha *et al.*, 2011).

*Humectantes.* Pueden agregarse especialmente en geles nasales, dentro de los humectantes utilizados se encuentran: glicerina, sorbitol y manitol. Además, evitan la irritación nasal y no afectan la absorción de medicamentos (Kushwaha *et al.*, 2011).

*Tensoactivos.* Pueden modificar la permeabilidad de las membranas nasales facilitando la absorción de los fármacos, para ello comúnmente se emplea polisorbato 80 y 20. Los tensoactivos también aumentan la estabilidad de la suspensión (Kushwaha *et al.*, 2011).

*Viscosantes.* La mayoría de los productos comercializados contiene dentro de su formulación agentes que modifican la viscosidad (por ejemplo, carboximetilcelulosa

sódica, hidroxipropil celulosa, polivinilpirrolidona), para aumentar el tiempo de contacto entre el fármaco y la mucosa nasal por lo cual se aumenta el tiempo de permeación (Degenhard *et al.*, 2015).

La elección de los excipientes dentro de una formulación nasal dependerá de la solubilidad y la estabilidad del fármaco, así como del tipo de formulación que se vaya a administrar en la vía nasal (Ghori *et al.*, 2015).

### **3.2.2.1 Tipos de formulaciones para administración nasal**

*Gotas nasales:* son un sistema de administración simple, pero presentan una baja precisión de dosificación, pérdidas inespecíficas de dosis y un alto riesgo de contaminación debido a que se suministran habitualmente en envases multidosis. Estas formulaciones son generalmente para un efecto local (Ghori *et al.*, 2015).

*Sprays nasales:* pueden ser sistemas de solución, suspensión o emulsión de base acuosa, hidroalcohólica o no acuosa. Son mucho más precisos que las gotas, sin embargo, al igual que las gotas nasales también presentan el problema de pérdidas inespecíficas (Hemal *et al.*, 2011).

*Geles nasales.* Son materiales sólidos o semisólidos, las propiedades reológicas de los geles dependen del tipo de polímero y de su concentración. Los productos comercializados para automedicación en las partes inferiores de la cavidad nasal contienen ácido hialurónico o hipromelosa. El problema de estas formulaciones es que no pueden ser administradas con facilidad mediante un dispositivo de liberación (Gänger & Schindowski, 2018).

*Polvos nasales:* es una mezcla seca del principio activo y los excipientes que están destinados a ser introducidos en la fosa nasal mediante un dispositivo adecuado. El problema principal que presentan es la irritación en la mucosa nasal que producen, debido a que los componentes están en estado seco y se humectan mediante el agua que se encuentra en los tejidos. Sin embargo, las formulaciones en polvo

tienen ventajas sobre las formulaciones líquidas, que incluyen la estabilidad del fármaco, y que se pueden administrar dosis más altas (Tanaka *et al.*,2017).

### **3.2.2.2 Polímeros mucoadhesivos**

El aclaramiento mucociliar es uno de los factores importantes que limitan la administración de fármacos, por lo tanto, una de las estrategias para mejorar la absorción nasal de los fármacos es reducir o bloquear el aclaramiento mucociliar. Dentro de las estrategias se encuentran la implementación de polímeros mucoadhesivos, los cuales prolongan el tiempo de retención en la cavidad nasal aumentando el tiempo de contacto entre el fármaco y la mucosa nasal (Tanaka *et al.*,2017).

Se han estudiado diversos polímeros mucoadhesivos como los micro y nanoportadores de fármacos para la administración nasal, debido a que por sus propiedades promueven un contacto cercano con la superficie de la mucosa, mientras que su tamaño permite una fácil penetración (Chonkar *et al.*, 2015). Por ejemplo, las nanopartículas a base del polímero quitosano (CS) (Wang *et al.*, 2008), maltodextrina (Betbeder *et al.*, 2000), polietilenglicol (PEG) (Lai *et al.*, 2007), ácido poliláctico (PLA) (Zhang *et al.*, 2006), polímero de ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA) (Seju *et al.*, 2011) y el dendrímero de poliamidoamina (PAMAM) (Kim *et al.*, 2012). Polímeros como el quitosano y alcohol polivinílico (PVA) se han estudiado como microportadores de proteínas como la insulina (Nasiri *et al.*, 2017). Ejemplos de productos basados en péptidos nasales que han aparecido en el mercado son calcitocina (Miacalcin®), desimopresina (DDVAP®), nafarelina (Synarel®), buserelina (Suprecur®) y oxitocina (Syntocinon®) (Costantino *et al.*, 2007).

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El sistema vacunal almidón-DFAtag-antígenos, ha demostrado ser eficiente para la vacunación por vía oral (mediante sonda intragástrica) e intranasal (mediante goteo) de ratones BALB/c. Su baja toxicidad, aplicabilidad con una amplia gama de péptidos y proteínas y bajo costo, resultan ventajas con alto potencial para el escalamiento y uso como vacuna para animales y humanos. Sin embargo, para que esto ocurra, primero se deben buscar formas en las que se pueda administrar la vacuna en otros modelos animales y haciendo escalamiento de dosis, sin que se vea afectada su actividad biológica comprobada, su estabilidad y las ventajas previamente mencionadas. Para lograrlo, se propone administrar la vacuna por vía oral mediante comprimidos entéricos y por vía intranasal se propone administrar la vacuna suspendida en un mucoadhesivo.

## **5. HIPÓTESIS**

El sistema vacunal almidón-DFAtag-antígenos conservará su integridad y actividad biológica después de aplicarse en dos formas farmacéuticas, la primera para su administración oral y la segunda para su administración nasal.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. OBJETIVO GENERAL.**

Desarrollar dos formas farmacéuticas, una para la administración oral y otra para la vía intranasal del sistema vacunal almidón-DFAtag-antígenos.

### **6.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

Evaluar *in vitro* el efecto de la compresión y posterior recubrimiento de película entérico sobre la integridad de la vacuna.

Evaluar *in vitro* el efecto de la inclusión del mucoadhesivo que se utilizarán como vehículo de la vacuna sobre su integridad.

Evaluar *in vivo* la actividad biológica de la vacuna, bajo sus nuevas formas farmacéuticas utilizando conejos raza Nueva Zelanda como modelo de estudio.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Farmacotecnia (N110), del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-X en colaboración con el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología C034 del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y en la Unidad de Constatación de Productos Químico-Biológicos y Bioterio FMVZ, UNAM.

### **7.1 Reactivos**

En la elaboración de los comprimidos del sistema vacunal almidón-DFAtag-antígenos se utilizaron: la proteína recombinante Tc-DFA inmovilizada en micropartículas de almidón (Patente Mx/a/2012/005765), lactosa monohidratada (Meggler Pharma - Excipients & Technology Lote.L1014A4952) y crospovidona (Ashlan Lote.03700177318). En el recubrimiento de película se utilizó EasyCoat® Blanco EAS054 el cual contiene como base el copolímero de ácido metacrílico y etil acrilato, como plastificante al polietilenglicol (DVA Mexicana S.A de C.V) y se utilizó agua desionizada como disolvente.

Los materiales utilizados para la formulación nasal fueron: la proteína recombinante Tc-DFA inmovilizada en micropartículas de almidón (Patente Mx/a/2012/005765), alcohol polivinílico (PVA) PM 85 000- 124 000 (Sigma Lote.09501BE), cloruro de sodio (J.T. Baker Lote.X32C65), fosfato de sodio monobásico (J.T. Baker Lote.V02C2), fosfato de sodio dibásico (J.T. Baker Lote.X28C05), ácido cítrico monohidratado (J. T. Baker Lote.F33457), carbonato de sodio (J.T. Baker Lote.A25152), bicarbonato de sodio (J.T. Baker Lote.N20334), Tween 20 (Sigma Lote.053K00711), imidazol (Sigma Lote. #WXCB0349V), maltosa (Sigma Lote. #SLBH7700V).

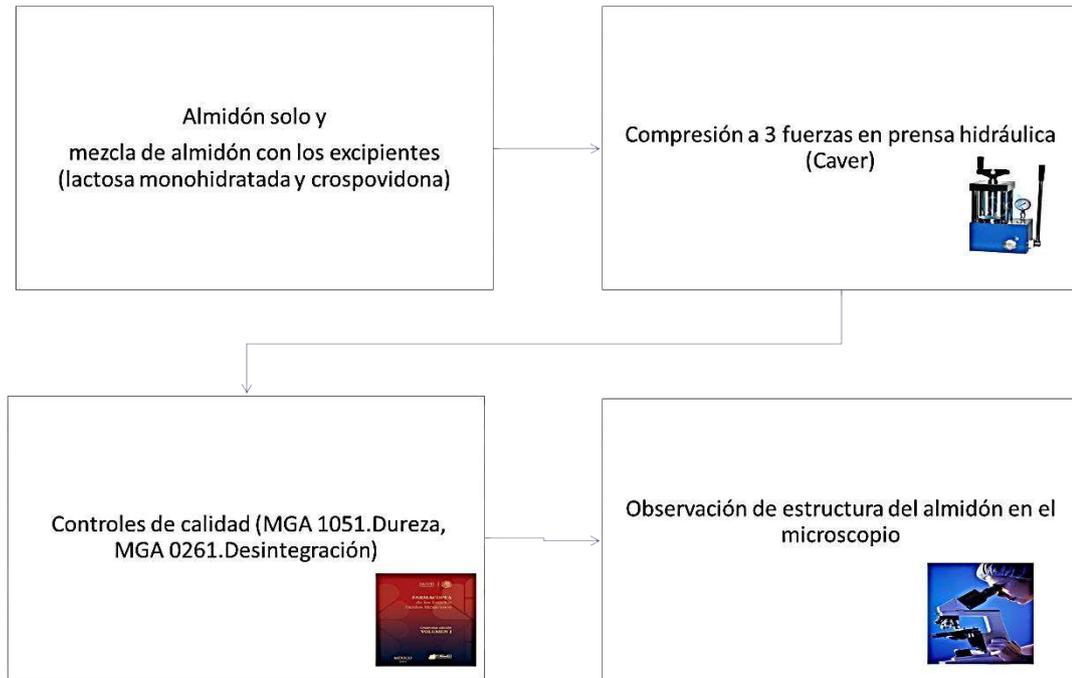
## **7.2 Elaboración de la forma farmacéutica oral para el sistema vacunal almidón-DFAtag-antígenos**

### **7.2.1. Efecto de la compresión sobre la estructura del almidón.**

Se realizaron ensayos preliminares del efecto de la compresión sobre la estructura de las micropartículas de almidón (Patente Mx/a/2012/005765), para observar si su estructura era capaz de soportar la fuerza de compresión aplicada durante el proceso de compresión directa y para asegurar que conservaba su estructura, la cual funciona como un sistema particulado de entrega de antígenos (Guillén *et al.*, 2014; Moreno-Mendieta *et al.*, 2014).

La fabricación de los comprimidos para los ensayos preliminares consistió en: 1) Realizar un comprimido mediante compresión directa en prensa hidráulica (Carver, modelo 3912) con una fuerza de compresión de 250 psi utilizando únicamente 200 mg de almidón (Patente Mx/a/2012/005765), 2) Elaborar comprimidos mediante compresión directa utilizando prensa hidráulica (Carver, modelo 3912), los cuales se realizaron mezclando 150 mg de almidón (Patente Mx/a/2012/005765) con los excipientes de compresión directa: lactosa monohidratada y crospovidona con las cantidades de 87.5 y 12.5 mg respectivamente. Durante 10 minutos se mezcló en un mezclador de pantalón, posteriormente se colocó el total de la mezcla (250 mg) en la matriz, se utilizaron punzones de 9 mm y se emplearon diferentes fuerzas de compresión (250, 500 y 750 psi). Se realizó el comprimido sólo con almidón para ver si la adición de los excipientes influía en la estructura de almidón al comprimirse. Los comprimidos fueron triturados en mortero y suspendidos en 1 mL de amortiguador citrato-fosfato 10 mM pH 6.6, a partir de esta se preparó otra suspensión que quedó con una concentración de 25 mg/mL aproximadamente y se observó al microscopio de luz a 40X si la estructura del almidón (Patente Mx/a/2012/005765) se mantenía. A los comprimidos que contenían almidón (Patente Mx/a/2012/005765) y los excipientes (lactosa monohidratada y crospovidona) adicionados a la formulación se les realizaron controles de calidad

MGA 1051. Resistencia a la ruptura (dureza) y MGA 0261. Desintegración marcados en la FEUM 2014, para establecer la fuerza de compresión en la que mantuviera estructura del almidón, pero también se obtuviera una dureza adecuada capaz de resistir el proceso de recubrimiento pelicular entérico, pero con un tiempo de desintegración del comprimido aceptable (figura 3).



**Figura 3.** Esquema de la evaluación *in vitro* del efecto de la compresión en la estructura del almidón.

La formulación propuesta se realizó con base en el almidón (Patente Mx/a/2012/005765) puesto que es el vehículo de antígenos y buscando evitar incompatibilidades se adicionó en un 60%. Los demás excipientes se seleccionaron por su función dentro de la formulación, como la lactosa monohidratada adicionada al 35%, la cual es un diluyente soluble que proporciona el volumen adecuado al comprimido, y la crospovidona añadida al 5% que aparte de ser un desintegrante ayuda a obtener comprimidos de alta dureza a baja presión (lo establecido en el *Handbook of Pharmaceutical Excipients*).

### **7.2.2. Fabricación de los comprimidos de TcDFAtag-almidón**

Una vez establecida la fuerza de compresión, la formulación se ajustó para obtener comprimidos de menor tamaño (9 mm a 7 mm), para facilitar la administración debido a la anatomía de los conejos Nueva Zelanda eran más fácil de administrar, respetándose el porcentaje de las concentraciones de cada uno de los componentes previamente seleccionados: 60% de almidón, 35% de lactosa monohidratada y 5% de crospovidona.

Los comprimidos se elaboraron mediante compresión directa en la prensa hidráulica (Carver, modelo 3912), las materias primas (90 mg de almidón del cual 25 mg contenían 250 µg de la proteína recombinante TcDFA inmovilizada, 52.5 mg de lactosa monohidratada y 7.5 mg de crospovidona) se mezclaron por 10 minutos en un mezclador de pantalón, se colocó el total de la mezcla (150 mg) en la matriz, y con punzones de 7 mm se comprimió a 750 psi por 10 segundos. A los comprimidos se les realizaron los controles de calidad indicados en la FEUM 2014 (MGA 1051. Resistencia a la ruptura (dureza), MGA 0261. Desintegración y MGA 1041. Friabilidad).

### **7.2.3. Recubrimiento pelicular entérico de los comprimidos de TcDFAtag-almidón**

En la preparación de la dispersión de recubrimiento, se colocaron 400 mL de agua en un vaso de precipitados y se agitó para formar un vórtice. Por separado se pesaron 140 g de polvo blanco de EasyCoat® Blanco (copolímero de ácido metacrílico-etil acrilato) y se agregó al centro del vórtice líquido de manera constante, una vez incorporado todo el polvo de recubrimiento se dejó en agitación durante 40 minutos. El proceso de recubrimiento entérico se realizó empleando un bombo convencional y una pistola de aspersion binaria, la tabla 7 resume las condiciones de trabajo. Los comprimidos de TcDFAtag de 7 mm se precalentaron a 35°C. La dispersión ya preparada al 20% de sólidos de EasyCoat® blanco se dispersó con una presión de aire de 25 psi, esperando una ganancia en peso del 14%. Para evaluar la influencia del recubrimiento entérico en la desintegración del

comprimido, se realizó la prueba de MGA 0261. Desintegración “Tabletas con capa ácido resistente” a los comprimidos con recubrimiento entérico, marcado en la FEUM 2014.

**Tabla 7.** Condiciones generales de trabajo para el recubrimiento entérico de los comprimidos de TcDFAtag-almidón.

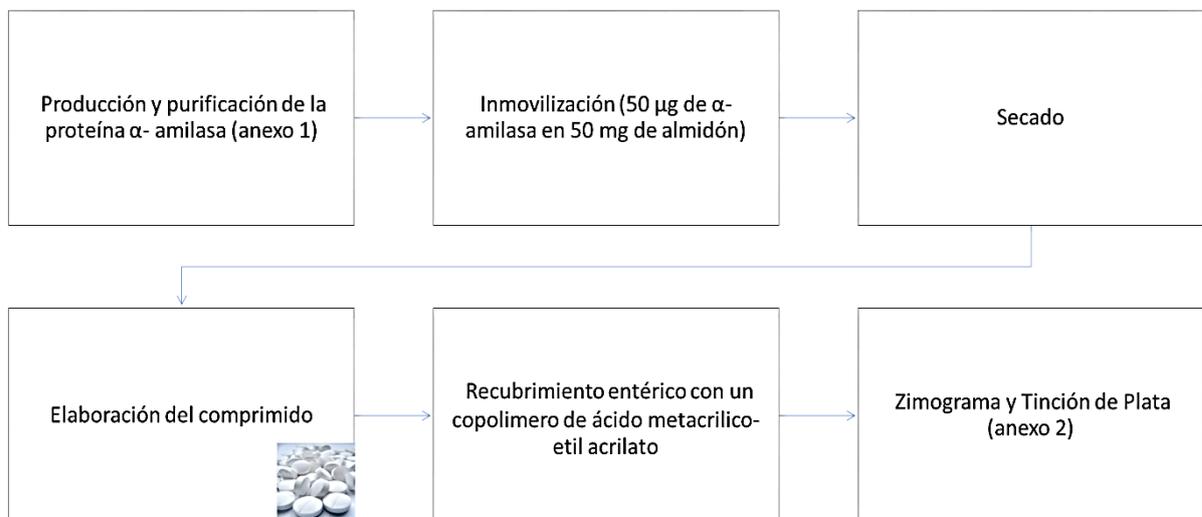
Condiciones de operación	Parámetro
T° aire de entrada	45°C
T° aire de precalentado	35°C
T° de producto	35°C
Presión de atomización (psi)	25 psi
Distancia de boquilla-lecho	10 cm
Velocidad del bombo	20 rpm

### **7.3. Evaluación *in vitro* del efecto de la compresión y recubrimiento de película entérico sobre la integridad de la vacuna.**

#### **7.3.1 Evaluación *in vitro* del efecto de la compresión y recubrimiento entérico sobre la proteína $\alpha$ -amilasa**

Para llevar a cabo la evaluación *in vitro* del efecto de la compresión y recubrimiento de la película entérica sobre la integridad de la vacuna, se estandarizó la técnica utilizando como modelo la proteína  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* (producida y purificada como se describe en el anexo 1) la cual contiene de manera natural al DFA, permitiendo su inmovilización en las micropartículas de almidón para su posterior inclusión dentro de la formulación de comprimidos y seguir el proceso de fabricación de comprimidos y recubrimiento pelicular entérico antes mencionado (apartado 7.2.2 y 7.2.3 respectivamente). Además de contener al DFA, se seleccionó a la proteína  $\alpha$ -amilasa porque es una enzima amilolítica cuya actividad puede observarse a través de técnicas electroforéticas como zimograma, también se puede observar en el gel SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) mediante tinción de plata.

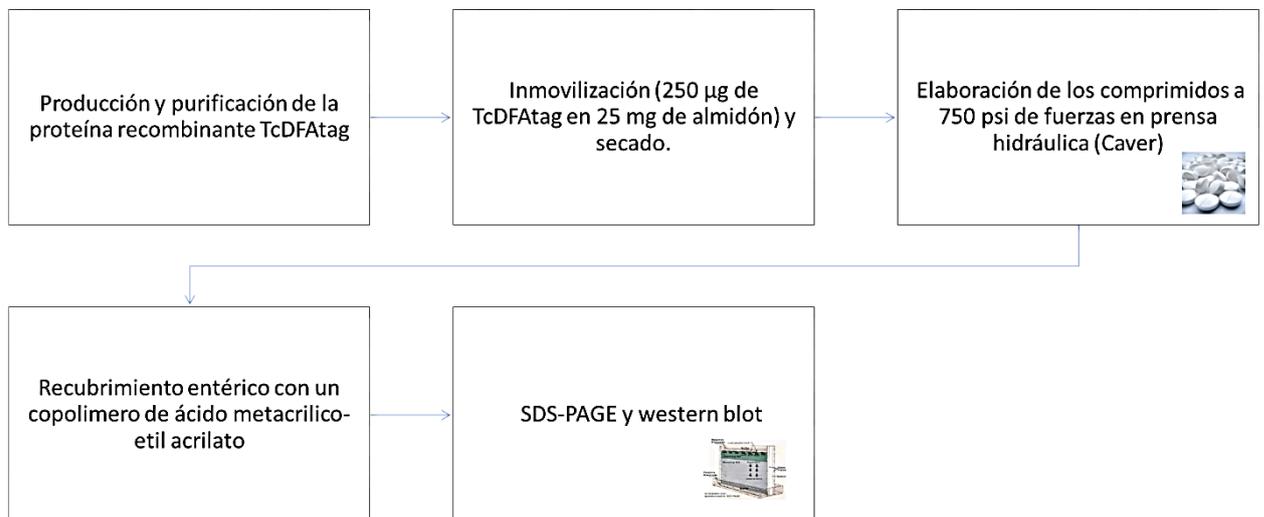
Para la evaluación se tomó uno de los comprimidos con recubrimiento entérico que contenía  $\alpha$ -amilasa (50  $\mu$ g de proteína inmovilizada en 50 mg de almidón), se partió a la mitad mediante la aplicación de fuerza mecánica y se suspendió bajo dos condiciones diferentes: la primera fue en 1 mL de amortiguador citrato-fosfato 25 mM pH 5 y en la condición 2 en amortiguador citrato-fosfato 20 mM pH 7. En ambos casos, posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 4 minutos y se desechó el sobrenadante, para poder eluir la enzima  $\alpha$ -amilasa que se encontraba mezclada entre los excipientes, se utilizó un análogo estructural del almidón, la  $\beta$ -ciclodextrina a una concentración de 8 mM en amortiguador citrato-fosfato 25 mM pH 5. Con las eluciones se realizó un gel de poliacrilamida para revelar actividad por zimograma y proteínas por tinción con plata (como se describe en el anexo 2). En la figura 4 se resume el proceso.



**Figura 4.** Esquema de la evaluación *in vitro* de la integridad de la proteína  $\alpha$ -amilasa en el comprimido.

### 7.3.2 Evaluación *in vitro* del efecto de la compresión y recubrimiento entérico sobre la proteína recombinante TcDFAtag

Se llevó a cabo la producción y purificación de la proteína recombinante TcDFAtag (anexo 3) para su posterior inmovilización en las micropartículas de almidón, se elaboraron los comprimidos (apartado 7.2.2) y el recubrimiento pelicular entérico (apartado 7.2.3). El comprimido se partió a la mitad mediante la aplicación de fuerza mecánica en un mortero y se suspendió en 1 mL de amortiguador citrato-fosfato 20 mM pH 7, posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 4 minutos y se desechó el sobrenadante, se eluyó a la proteína recombinante TcDFAtag utilizando  $\beta$ -ciclodextrina 8 mM en amortiguador citrato-fosfato 20 mM pH 7. Se evaluó su integridad mediante las técnicas electroforéticas SDS-PAGE para visualizar a TcDFA en su peso molecular correspondiente (106.9 kDa) por tinción de Coomassie y por western blot (las técnicas se realizaron como indica el anexo 4). En la figura 5 se resume la estrategia experimental.



**Figura 5.** Esquema de la evaluación *in vitro* de la integridad de la proteína recombinante TcDFAtag en el comprimido recubierto.

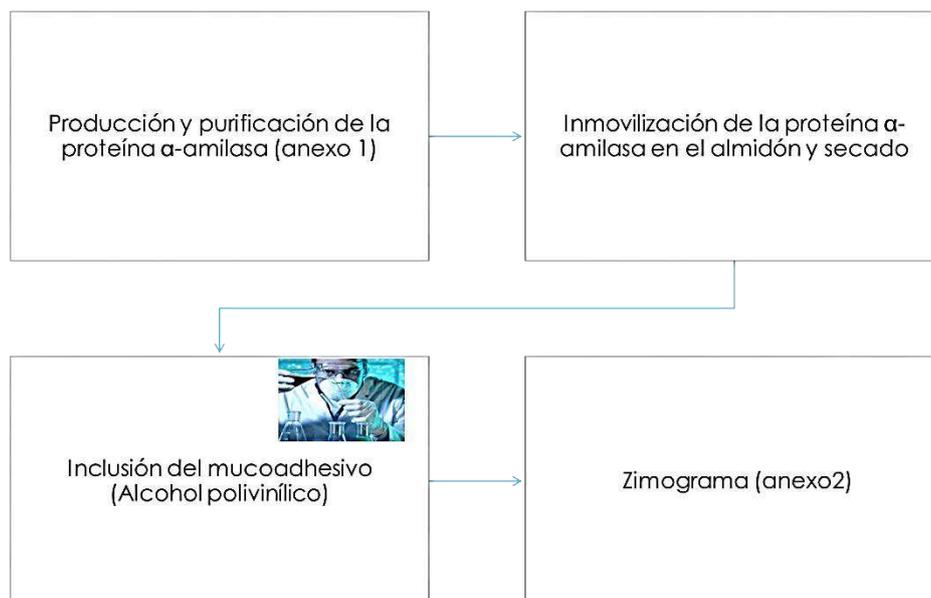
#### **7.4. Elaboración de la forma farmacéutica intranasal para el sistema vacunal almidón-DFAtag-antígenos**

En primer lugar, se midió la viscosidad del alcohol polivinílico (PVA) el cual es un polímero mucoadhesivo, puesto que la viscosidad es la propiedad que le permite aumentar el tiempo de contacto entre el fármaco y la mucosa nasal, la selección de la concentración se hizo con base en la mayor viscosidad. El PVA de peso molecular (PM) de 146 000-186 000 se preparó al 1% y el de PM 85 000-124 000 se preparó al 2%, a ambos se les midió la viscosidad empleando el viscosímetro Brookfield, utilizando la aguja del número 1 a una velocidad de 200 rpm.

#### **7.5. Evaluación *in vitro* del efecto de la inclusión del mucoadhesivo sobre la integridad de la vacuna.**

##### **7.5.1 Evaluación *in vitro* del efecto de la inclusión del mucoadhesivo sobre la integridad de la proteína $\alpha$ -amilasa**

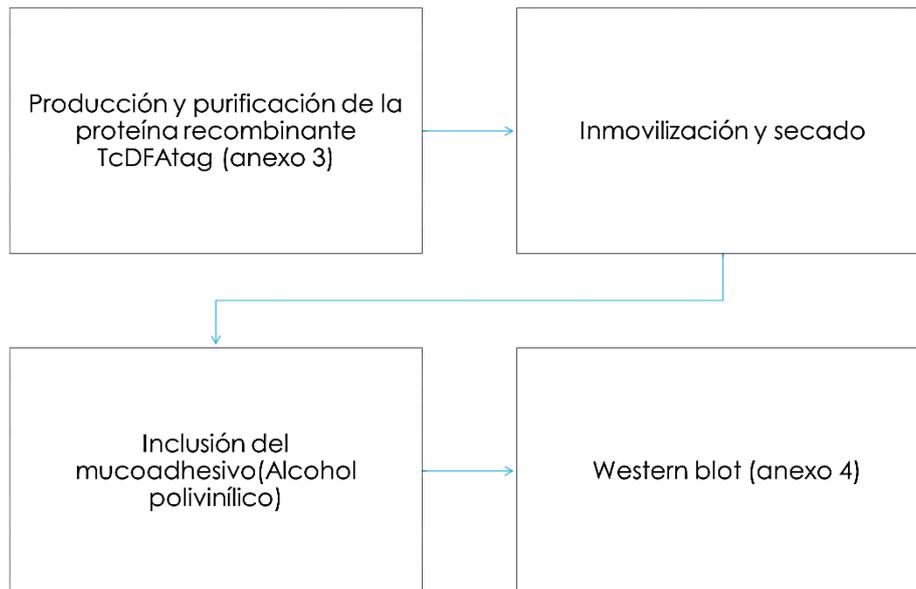
Para llevar a cabo la evaluación *in vitro* del efecto de la inclusión del mucoadhesivo (alcohol polivinílico PM 85 000-124 000 al 2%) sobre la integridad de la vacuna, se llevó a cabo la producción, purificación e inmovilización en el almidón (como se describe en el anexo 1) de la proteína  $\alpha$ -amilasa (30  $\mu$ g de  $\alpha$ -amilasa en 4 mg de almidón), posteriormente se le adicionó el PVA al 2% y se suspendió para que la proteína estuviera en contacto con el mucoadhesivo, después se centrifugó a 8000 rpm durante 4 minutos, se lavó dos veces con amortiguador citrato-fosfato 25 mM pH 5 y se analizó mediante zimograma (como se indica en el anexo 2). En la figura 6 se resume la estrategia experimental.



**Figura 6.** Esquema de la evaluación de la integridad *in vitro* de la proteína  $\alpha$ -amilasa en el mucoadhesivo.

### 7.5.2 Evaluación *in vitro* del efecto de la inclusión del mucoadhesivo sobre la integridad de la proteína recombinante TcDFAtag

La integridad de la proteína recombinante TcDFAtag posterior a la inclusión del mucoadhesivo se evaluó mediante western blot. Para ello se realizó la producción, purificación e inmovilización en las micropartículas de almidón (anexo 3) de la proteína recombinante TcDFAtag (150  $\mu$ g de proteína en 7.5 mg de almidón), posteriormente se le adicionó PVA al 2% y se suspendió para que la proteína estuviera en contacto con el mucoadhesivo, después se centrifugó a 8000 rpm durante 4 minutos y se lavó dos veces con amortiguador citrato-fosfato 20 mM pH 7 y se analizó mediante western blot (anexo 4). En la figura 7 se resume la estrategia experimental.



**Figura 7.** Esquema de la evaluación *in vitro* de la integridad de la proteína recombinante TcDFAtag en el mucoadhesivo.

### 7.6. Protocolo de inmunización y toma de muestras.

El ensayo de inmunogenicidad se realizó en la Unidad de Constatación de Productos Químico-Biológicos y Bioterio de la FMVZ, UNAM. Se utilizaron quince conejos machos Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) sanos de 1.5 kg aproximadamente, obtenidos en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv), de la FMVZ, UNAM. El experimento se llevó a cabo bajo el protocolo de investigación aprobado por el CICUAL del Bioterio del IIB, UNAM con el número 196 y siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999 sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Los animales se acomodaron en grupos de 3 y se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura, humedad, ciclos de luz oscuridad y con agua y alimento *ad libitum*. Los grupos experimentales se muestran en la tabla 8.



## **7.7. Evaluación de la actividad biológica *in vivo***

### **7.7.1. Respuesta inmune humoral: Detección de anticuerpos**

La respuesta sistémica de anticuerpos se determinó midiendo el nivel de IgG en suero mediante la técnica de ELISA. Placas de EIA/RIA de 96 pozos (Costar 3590) se recubrieron con 100  $\mu$ L del antígeno/pozo (proteína Tc a 2.5  $\mu$ g/mL en amortiguador de carbonato 0.05 M pH 9.6, producida y purificada como se indica en el anexo 5), y se incubaron durante la noche a 4°C. Los pozos se lavaron tres veces con amortiguador fosfato 0.05% Tween 20 (PBS-5T) y posteriormente se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) 0.25% en PBS-5T durante 1 hora a temperatura ambiente y se repitieron los lavados. Se realizaron pools de los sueros de los conejos de cada grupo y se diluyeron en serie de 1:75 a 1:2400 en PBS-5T en un volumen final de 100  $\mu$ L pozo. Las placas se incubaron durante la noche a 4°C y se lavaron como se indicó anteriormente. Se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo-peroxidasa de rábano (Merck 12-348) en una dilución 1:15000 y se incubó durante 2 horas a 37°C (100  $\mu$ L/pozo). Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con el sustrato FAST OPD (SIGMA), y se determinó la absorbancia a 450 nm en un Multiskan FC (Thermo Scientific). Previamente, la concentración de antígeno para sensibilizar las placas y la cantidad de anticuerpo secundario se estandarizaron mediante la prueba de Criss-Cross (Hornbeck, 1991).

### **7.7.2. Respuesta inmune celular: estímulo *in vitro* de esplenocitos y cuantificación de INF- $\gamma$ en sobrenadante**

Para el cultivo celular, los bazos se procesaron para obtener células totales como se indica en el anexo 6. Se utilizaron placas de cultivo de 24 pozos (Costar) a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por pozo en 750  $\mu$ L de RPMI 1460 (Gibco 1640) complementado con 10% de SFB, HEPES 25 mM, piruvato de sodio 1 mM, Anti-

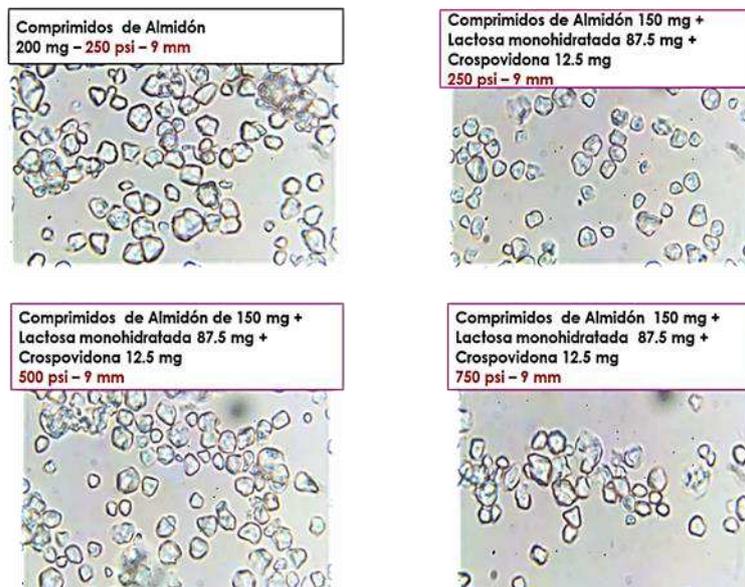
Anti 1X (penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 100  $\mu$ L), aminoácidos no esenciales 1X y  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM. Las células sin estímulo fueron incubadas 3 horas a 37°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Posteriormente se incubaron en presencia o ausencia de las proteínas Tc o TcDFAtag (20  $\mu$ g/pozo) preparadas en 250  $\mu$ L del medio RPMI complementado. Se utilizó como control positivo la Conavalina A (CoA) (5  $\mu$ g/pozo). Las células fueron incubadas 48 y 72 h a 37°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Pasado el tiempo de incubación se cosecharon las células, se centrifugó a 1500 rpm, 5 minutos a 4°C, y se separaron los sobrenadantes, de los cuales se hicieron alícuotas y se almacenaron a -70°C hasta su uso. El IFN- $\gamma$  se determinó en los sobrenadantes utilizando el kit Rabbit IFN- $\gamma$  ELISA Kit, RAB1106 Cat No. 12352200 siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Elaboración de la forma farmacéutica oral para el sistema vacunal almidón-DFAtag-antígenos

#### 8.1.1. Efecto de la compresión sobre la estructura del almidón

Las imágenes de las micropartículas de almidón observadas mediante microscopio de luz después de su compresión a diferentes fuerzas, mostro que no había cambio en la morfología de las micropartículas de almidón, tanto en el comprimido que sólo contenía almidón, elaborado a una fuerza de compresión de 250 psi, como en los comprimidos elaborados con los excipientes (lactosa monohidratada y crospovidona) y con las fuerzas de compresión de 250, 500 y 750 psi. En todos los casos, los gránulos conservaron su forma poliédrica y su refringencia (figura 9), indicando que el almidón es capaz de soportar las fuerzas de compresión aplicadas y por lo tanto no afecta su función como vehículo de antígenos.



**Figura 9.** Evaluación del efecto de la compresión sobre las micropartículas de almidón.

Luego de las pruebas de control de calidad, se estableció que la mejor fuerza de compresión es de 750 psi al obtener la mayor resistencia a la fractura (dureza), estabilidad mecánica de comprimido para soportar el proceso de recubrimiento entérico, además que el tiempo de desintegración del comprimido era aceptable (menor a 30 minutos) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Dureza y tiempo de desintegración de los comprimidos con almidón sometidos diferentes fuerzas de compresión.

FORMULACIÓN 250 mg 9 mm	FUERZA DE COMPRESIÓN	DUREZA (Kgf)	TIEMPO DE DESINTEGRACIÓN (min)
 Almidón (150 mg)+ Lactosa Monohidratada (87.5 mg) + Crospovidona (12.5 mg)	250 psi	10.25	5
	500 psi	14.44	6
	750 psi	20.95	6

### 8.1.2. Controles de calidad de los comprimidos de Tc-DFAtag-almidón

Los resultados de las pruebas de calidad posterior a la fabricación de los comprimidos de TcDFAtag de 7 mm (apartado 7.2.2) se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9.** Controles de calidad indicados en la FEUM 2014 a los comprimidos de TcDFAtag-almidón.

MGA. 1051 Resistencia a la ruptura (Dureza)	MGA. 1041 Friabilidad	MGA. 0261 Desintegración
16.05 kilogramo-fuerza (Kgf)	0.04%	9 minutos

Los comprimidos de TcDFAtag de 7 mm presentaron una dureza adecuada y una mínima friabilidad (de acuerdo con la FEUM 2014 no mayor que 1%) para soportar la posible erosión provocada durante la etapa del recubrimiento pelicular entérico, así como un tiempo de desintegración aceptable.

### 8.1.3. Recubrimiento pelicular entérico a los comprimidos de TcDFAtag-almidón

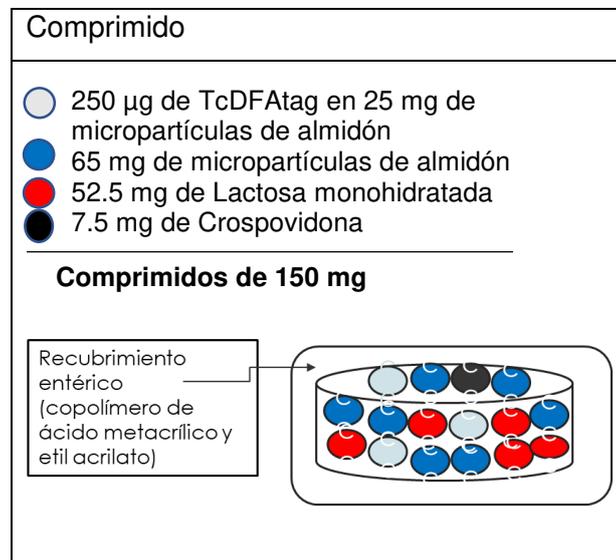
Después del recubrimiento pelicular entérico (apartado 7.2.3), se obtuvo un rendimiento de 97.8% con un aumento en peso del 11%. La desintegración de los comprimidos de TcDFAtag-almidón recubiertos fue de 17 minutos en fluido intestinal simulado a 37°C, asegurando la liberación TcDFAtag en el intestino delgado (Tabla 10).

**Tabla 10.** Prueba de “Tabletas con capa ácido resistente” a los comprimidos con recubrimiento pelicular entérico

<b>MGA.0261 Desintegración. Tabletas con capa ácido resistente</b>	
Fluido gástrico simulado a 37°C Trascurrido 1 hora, no se observó desintegración, rompimiento o ablandamiento.	Fluido intestinal simulado a 37°C Desintegración a los 17 min

En la figura 10 se presenta la formulación definitiva obtenida a partir de los resultados anteriores. Cada tableta consta de: 1. Sistema vacunal TcDFAtag-almidón (Patente Mx/a/2012/005765), 2. Almidón para evitar incompatibilidades, 3. Lactosa monohidratada como diluyente, seleccionado por sus propiedades de compresibilidad, flujo y solubilidad. 4. Crospovidona como disgregante, que permitirá la desintegración del comprimido en el medio acuoso liberando el principio activo; 5. Copolímero de ácido metacrílico-etil acrilato para el recubrimiento entérico debido a la ionización del polímero que a un pH concreto se disuelve, permitiendo resistir un pH ácido del estómago y degradándose al pH del intestino y liberando el

principio activo. Las concentraciones de los excipientes se resumen en el apartado 7.2.1

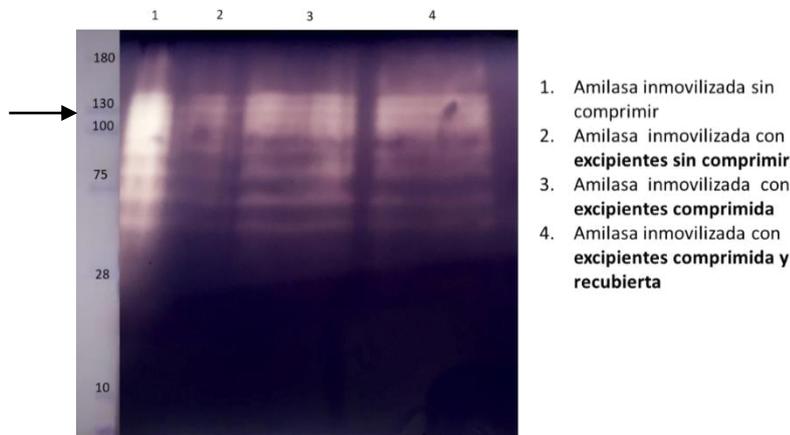


**Figura 10.** Formulación para la elaboración de los comprimidos para la vía oral.

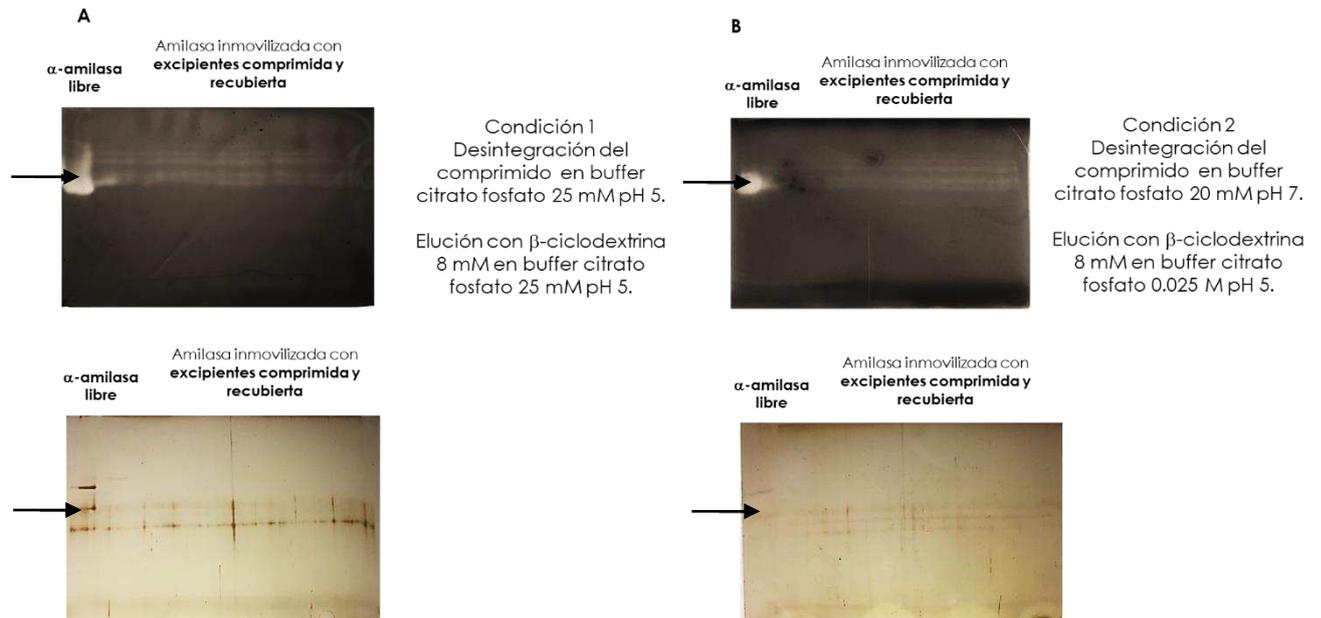
## 8.2 Evaluación *in vitro* del efecto de la compresión y recubrimiento de película entérico sobre la integridad de la vacuna.

### 8.2.1 Evaluación *in vitro* del efecto de la compresión y recubrimiento entérico sobre la proteína $\alpha$ -amilasa

Con el fin de evaluar si no había ningún efecto sobre la actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa, después de haber sido sometida a compresión, se determinó su actividad *in vitro* mediante un zimograma. Las zonas blancas en el zimograma son el resultado de la degradación del almidón (figuras 11 y 12) debido a la actividad amilolítica de la enzima  $\alpha$ -amilasa. En cuanto a la tinción con plata se observa después del revelado, la presencia de la proteína  $\alpha$ -amilasa (figura 12) lo que indica que la enzima se mantuvo en cada paso de la fabricación del comprimido. En resumen, la  $\alpha$ -amilasa soporta cada paso del proceso de fabricación del comprimido y recubrimiento sin afectar su actividad.



**Figura 11.** Zimograma de la proteína  $\alpha$ -amilasa en cada parte del proceso desde que se inmoviliza hasta que se encuentra dentro de la formulación del comprimido recubierto. La flecha indica la ubicación de  $\alpha$ -amilasa en su peso molecular (105 kDa). Marcador de peso molecular (Broad Range Standard BioRad).

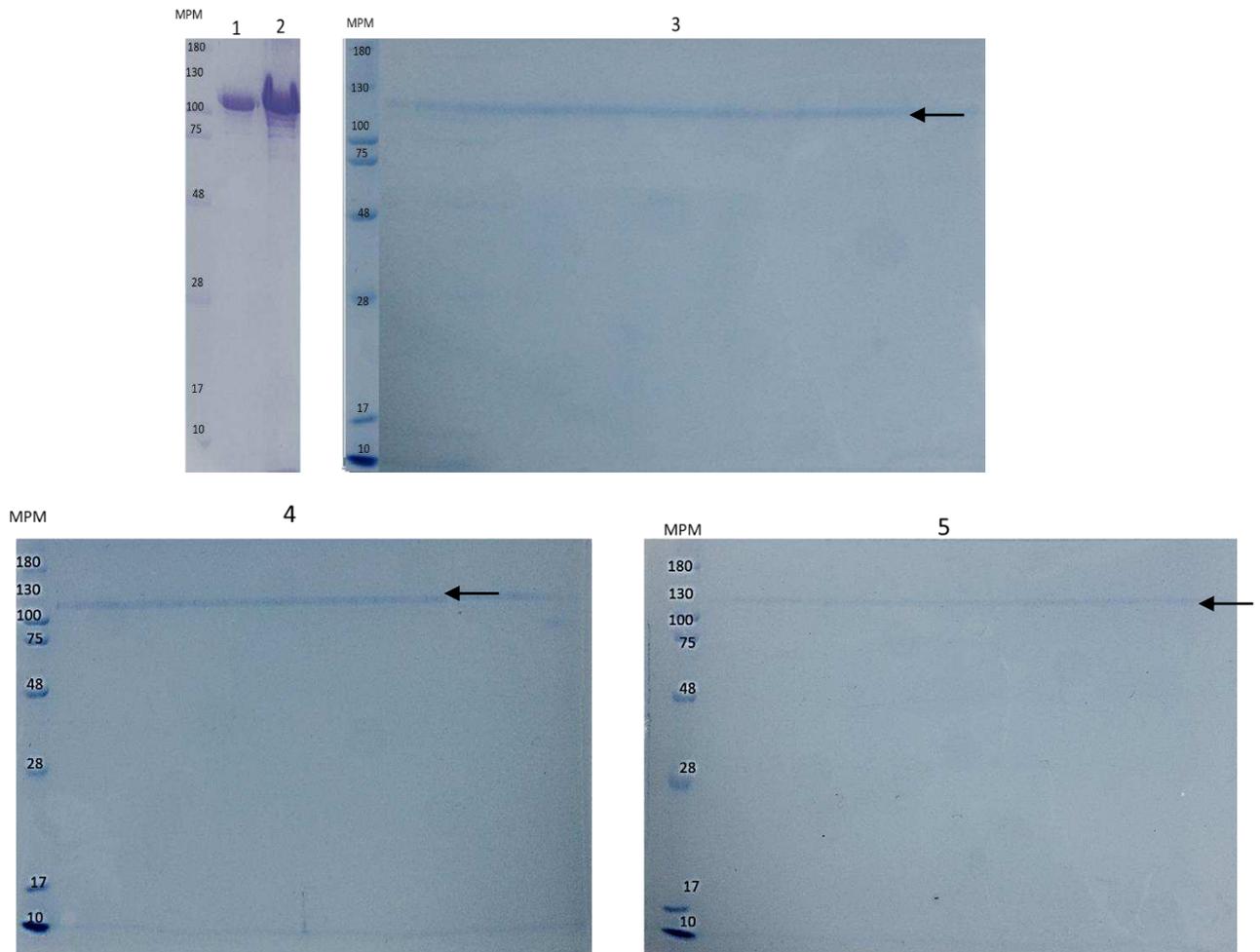


**Figura 12.** Proteína  $\alpha$ -amilasa del comprimido recubierto A-B: Zimograma, C-D: Geles SDS-PAGE revelado con nitrato de plata. Se realizó bajo dos diferentes condiciones, Condición 1) la desintegración se realizó en amortiguador citrato fosfato 25 Mm pH 5 y Condición 2) la desintegración se realizó en amortiguador citrato-fosfato 20 mM pH 7, la elución se realizó con el mismo amortiguador citrato-fosfato 25 mM pH 5.

### 8.2.2 Evaluación *in vitro* del efecto de la compresión y recubrimiento entérico sobre la proteína recombinante TcDFAtag

Los resultados de la evaluación realizados mediante SDS-PAGE (figura 13) de la integridad de la proteína recombinante TcDFAtag mostraron a la proteína en su peso molecular (106.9 kDa) en cada paso del proceso de fabricación de los comprimidos, que va desde la inmovilización de la proteína (250  $\mu$ g de proteína en 25 mg de almidón), el secado, la adición de excipientes, la compresión aplicando una fuerza de 750 psi (seleccionada como se explica en la sección 8.1) y el recubrimiento entérico. El revelado de la presencia de la proteína por western blot (figura 14), mostró a TcDFAtag en su peso molecular, aún después del recubrimiento del comprimido. Dado que la función de esta proteína es la

inmunogenicidad y esta sólo podía determinarse después del ensayo *in vivo*, era importante ver que la proteína no se viera afectada en su estructura.



**Figura 13.** Gel SDS-PAGE al 10% que muestra la estabilidad de la proteína TcDFAtag en cada paso del proceso. MPM: Marcador de Peso Molecular (Broad Range Standard BioRad). 1. TcDFAtag libre, 2. TcDFAtag inmovilizada sin comprimir, 3. TcDFAtag inmovilizada con excipientes sin comprimir, 4. TcDFAtag inmovilizada con excipientes comprimida, 5. TcDFAtag inmovilizada comprimida y recubierta. La fecha indica la ubicación de TcDFAtag en su peso molecular (106.9 kDa).



**Figura 14.** Proteína TcDFAtag analizada mediante western blot después el recubrimiento del comprimido. MPM: Marcador de Peso Molecular (Broad Range Standard BioRad). 1. TcDFAtag libre, 2. TcDFAtag inmovilizada con excipientes comprimida y recubierta. La flecha indica la ubicación de TcDFAtag en su peso molecular (106.9 kDa).

### 8.3 Elaboración de la forma farmacéutica intranasal para el sistema vacunal almidón-DFAtag-antígenos

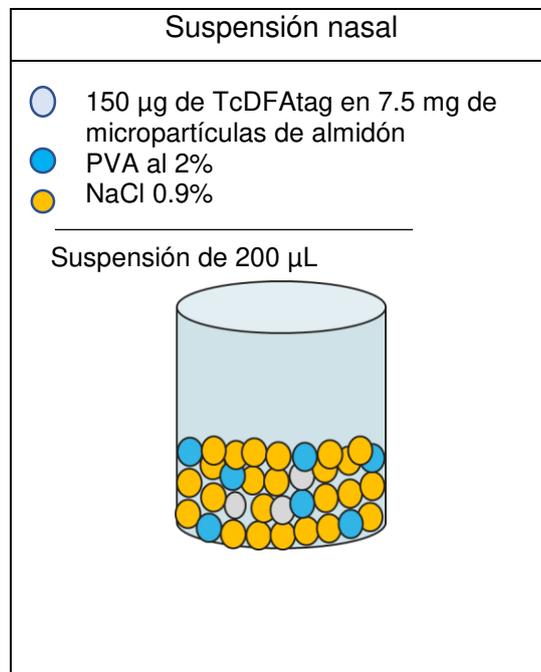
Debido a que la acción del principio activo o TcDFAtag administrado por vía intranasal depende del tiempo de estancia en el lugar de absorción y del contacto con el tejido epitelial nasal de los conejos, para aumentar la acción de la proteína recombinante, se incluyó en la suspensión nasal el alcohol polivinílico (PVA) que sirve como un mucoadhesivo de alta viscosidad. Las mediciones de la viscosidad del alcohol polivinílico de diferentes pesos moleculares y diferentes concentraciones utilizando el viscosímetro Brookfield se resumen en la tabla 11. La viscosidad para el PVA al 1% con PM 146 000-186 00 fue de 30.36 centipoise y para el PVA 2% con PM 85 000- 124 000 de 46.33 centipoise. Para la realización de la formulación se decidió utilizar el PVA al 2% con PM 85 000- 124 000 porque fue el porcentaje con mayor viscosidad y mejor torque.

**Tabla 11.** Mediciones de la viscosidad del alcohol polivinílico (PVA)

Excipiente	Peso molecular	pH	RPM	Viscosidad (cP)	Promedio	Torque	Promedio	Temperatura
PVA 2%	85 000 – 124 000	5.61	200	44.60	46.33	89.2%	91.3%	20°C
			200	47.15		90.3%		20°C
			200	47.25		94.5%		20°C
PVA 1%	146 000 – 186 000	5.29	200	30.50	30.36	61.0%	60.7%	20°C
			200	30.35		60.7%		20°C
			200	30.25		60.5%		20°C

Viscosímetro Brookfield, Aguja 1

La formulación de la suspensión nasal la cual consta de: 1. Sistema vacunal TcDFAtag-almidón, 2. Alcohol polivinílico al 2%, 3. Solución salina al 0.9% se muestra en la figura 15.

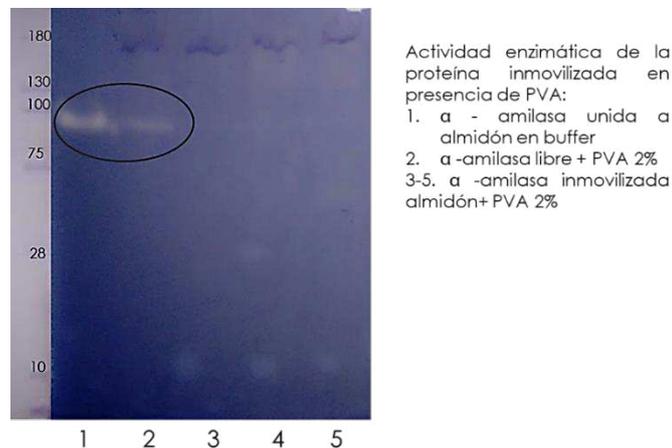


**Figura 15.** La formulación para la vía nasal.

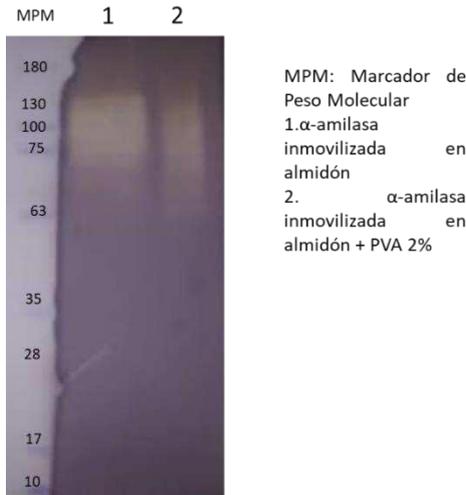
## 8.4 Evaluación *in vitro* del efecto de la inclusión del mucoadhesivo sobre la integridad de la vacuna.

### 8.4.1 Evaluación *in vitro* del efecto de la inclusión del mucoadhesivo sobre la integridad de la proteína $\alpha$ -amilasa

Para evaluar si hubo algún efecto de la adición del mucoadhesivo sobre la actividad de la  $\alpha$ -amilasa, se hicieron ensayos de actividad en zimograma. En la figura 16 se observan bandas blancas donde hubo degradación del almidón por efecto de la actividad de  $\alpha$ -amilasa libre mezclada con PVA al 2%, sin embargo, en el ensayo de la  $\alpha$ -amilasa inmovilizada en almidón y mezclada con el PVA al 2% no se observó nada debido a que la muestra no corrió adecuadamente en el gel y por lo tanto se volvió a analizar. En la figura 17 se siguió el procedimiento indicado en el apartado 7.5.1, donde se pudo observar a diferencia de la figura 16 la actividad de  $\alpha$ -amilasa inmovilizada en almidón después de estar en contacto con el PVA al 2%, indicando que no hubo efecto de la adición del mucoadhesivo sobre la actividad de la enzima.



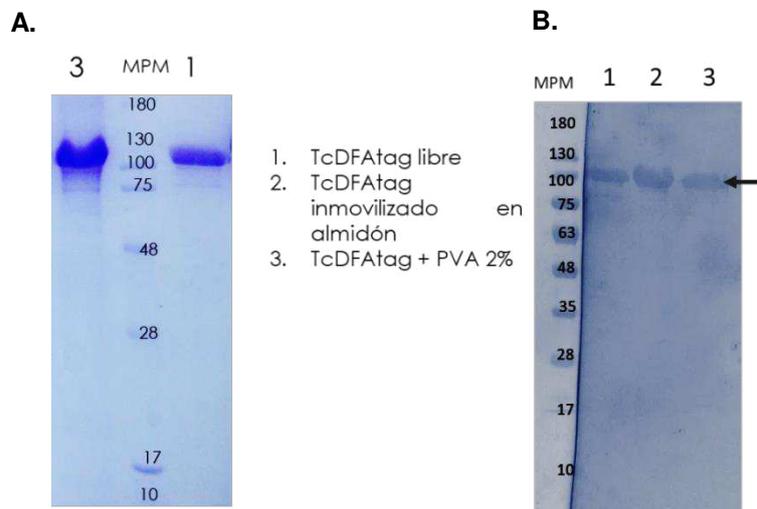
**Figura 16.** Actividad enzimática de  $\alpha$ -amilasa analizada mediante zimograma en presencia de PVA al 2%. Marcador de Peso Molecular (Broad Range Standard BioRad).



**Figura 17.** Actividad enzimática de  $\alpha$ -amilasa analizada mediante zimograma después de estar en presencia de PVA al 2%. MPM: Marcador de Peso Molecular (Broad Range Standard BioRad).

#### 8.4.2 Evaluación *in vitro* del efecto de la inclusión del mucoadhesivo sobre la integridad de la proteína recombinante TcDFAtag

Los resultados de la evaluación realizados mediante SDS-PAGE y western blot (figura 18) de la integridad de la proteína recombinante TcDFAtag, mostraron a la proteína en su peso molecular (106.9 kDa) después de haber estado en presencia de PVA al 2%, lo que indica que no hubo afectación de la estructura de TcDFAtag después de haber estado en contacto con el mucoadhesivo.

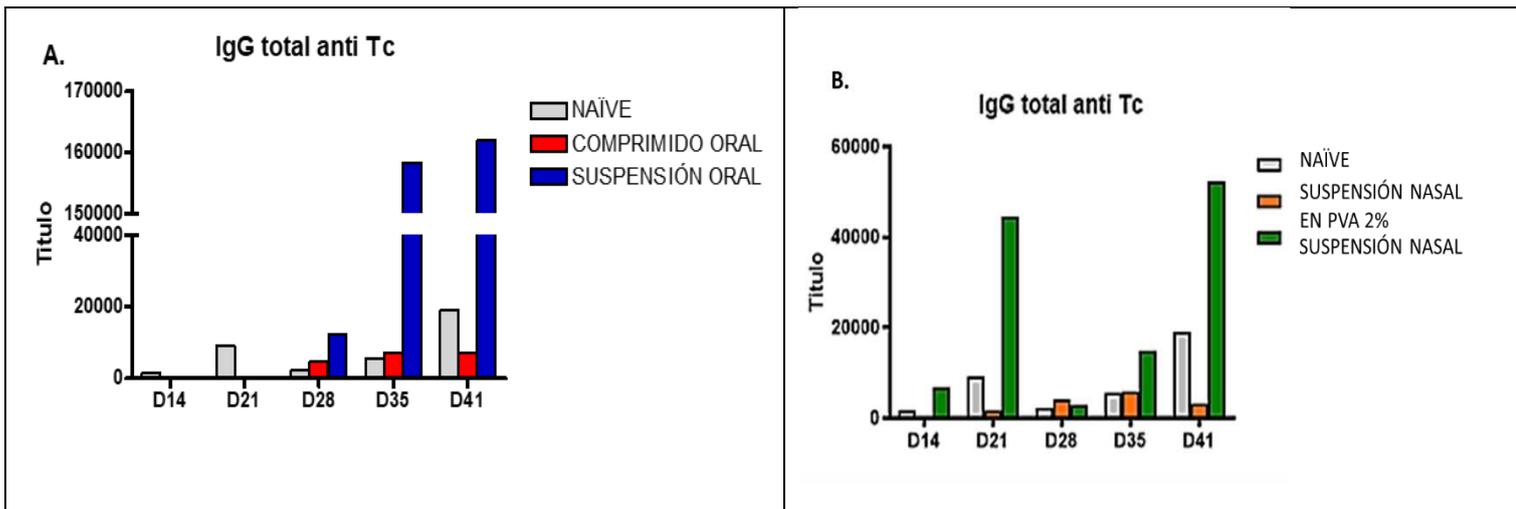


**Figura 18.** Proteína TcDFAtag analizada mediante A: Gel SDS-PAGE y B: Western blot después de estar en presencia de PVA al 2%. MPM: Marcador de Peso Molecular (Broad Range Standard BioRad). La fecha indica la ubicación de TcDFAtag en su peso molecular (106.9 kDa).

## 8.5 Evaluación de la actividad biológica *in vivo* de la vacuna

Para determinar el efecto de la forma farmacéutica en la inmunogenicidad de la proteína TcDFAtag, se evaluó la respuesta inmune humoral y celular en conejos. Para la respuesta inmune humoral se rastrearon anticuerpos séricos anti Tc en los animales de todos los grupos. Los resultados de ELISA mostraron un mayor título IgG en el grupo de suspensión oral en amortiguador citrato-fosfato 10 mM pH 7, en comparación con el grupo naïve (control negativo) y el grupo que recibió los comprimidos, en los días 35 y 41 (Figura 19.A y anexos 7 y 8).

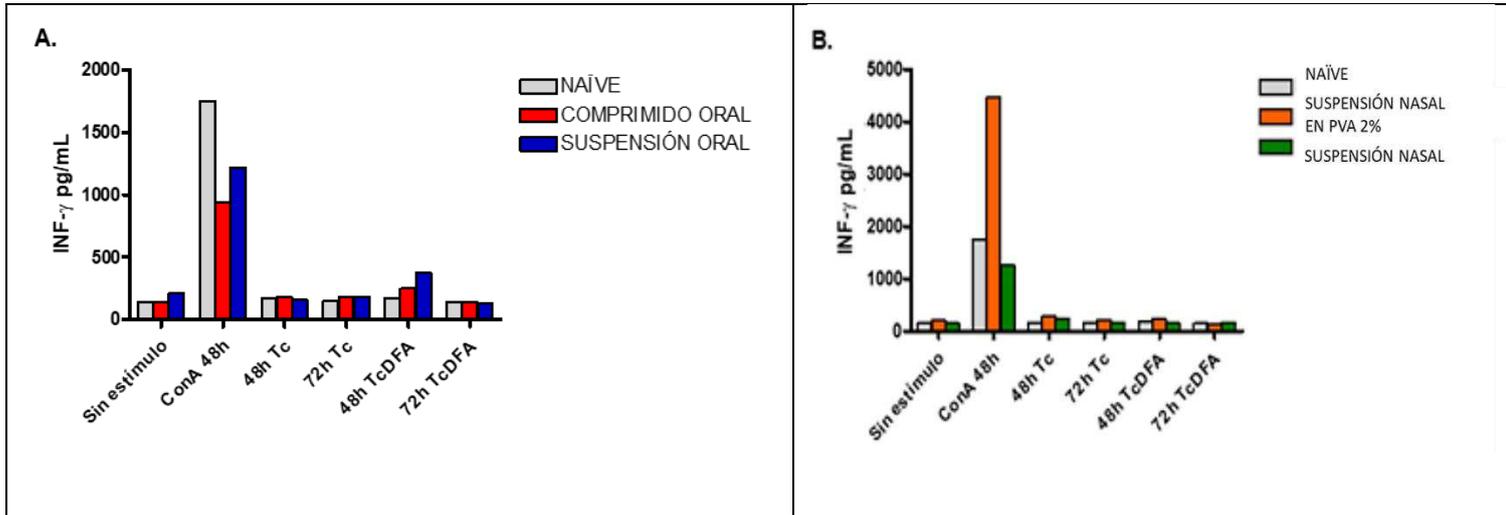
En cuanto a los grupos que recibieron la proteína por vía intranasal, al igual que ocurrió con los comprimidos, la proteína sin forma farmacéutica fue la que indujo mayor título de anticuerpos en comparación con el grupo naïve y el grupo de suspensión nasal, en los días 21 y 41 (Figura 19. B y anexos 7 y 8).



**Figura 19.** Inducción de los anticuerpos IgG anti-Tc específicos en los sueros de conejos inmunizados (A) por vía oral y (B) por vía nasal. Sueros obtenidos de pool de cada grupo de conejos, la absorbancia de fondo promedio (preinmune) se restó de la absorbancia de cada muestra.

Por otra parte, para determinar la respuesta inmune celular, se evaluó la presencia de INF- $\gamma$  en sobrenadante de cultivo celular de células de bazo estimuladas con 20  $\mu$ g de las proteínas Tc y TcDFA. Como se muestra en la figura 20 en ninguno de los sobrenadantes se detectó la citocina, indicando que sin importar la presencia o no de una forma farmacéutica, la respuesta inducida con la vacuna fue principalmente

humoral bajo el esquema de administración cada 7 días en tres ocasiones y con refuerzo al día 35.



**Figura 20.** INF- $\gamma$  en sobrenadante de cultivo de esplenocitos específica de Tc y TcDFA, a partir de esplenocitos aislados de conejos inmunizados con proteína TcDFAtag con y sin forma farmacéutica por (A) vía oral y (B) vía nasal. Los esplenocitos de todos los grupos liberaron INF- $\gamma$  después del estímulo con el mitógeno (ConA).

## 9. DISCUSIÓN

El DFAtag permite la unión específica de proteínas recombinantes sobre micropartículas de almidón, lo que ha permitido su uso como un vehículo para la administración oral y nasal de antígenos a ratones Balb-c sanos (Patente No. 347183). Con este sistema también se ha demostrado que las proteínas fusionadas con el dominio e inmovilizadas en la superficie de la partícula, tienen una mejor estabilidad en condiciones gástricas e intestinales simuladas (Moreno-Mendieta, 2014. Tesis de Doctorado, UNAM), así como una estabilidad prolongada de hasta 100 días almacenadas en seco y sin otros aditivos (Martínez, 2017, Tesis de Licenciatura, UNAM). Estas ventajas, así como su inocuidad y biocompatibilidad resultan importantes para cualquier vacuna. Sin embargo, como cualquier otro medicamento, las vacunas también requieren de una forma farmacéutica adecuada que procure otros beneficios tales como facilidad de dosificación, administración, fabricación y almacenamiento, todo a bajo costo.

Cuando la vía de administración de una vacuna es oral, el antígeno debe atravesar las condiciones del tracto digestivo desde la boca hasta el intestino delgado. La presencia de enzimas como amilasa salival y pancreática y proteasas como pepsina y quimiotripsina, así como un pH ácido en el estómago son algunas de las barreras a superar antes de llegar al sitio de inducción de respuesta inmune en GALT. Allí el antígeno debe ser capturado eficientemente por las células M y las células presentadoras de antígenos profesionales (las células dendríticas), quienes lo procesan y presentan a linfocitos T para una consecuente inducción de respuesta inmune adaptativa bien sea humoral o celular (O'Hagan 1998). Por lo tanto, la duración y la magnitud de la exposición al antígeno íntegro son fundamentales por esta vía para lograr la activación de células de memoria, especialmente porque el intestino está constantemente expuesto a todo tipo de antígenos de fuente endógena y exógena (Moyer *et al.*, 2016).

El desarrollo de las vacunas ha sido muy lento y de manera empírica, siendo las formas farmacéuticas parenterales empleadas primordialmente que las mucosales (Morefield *et al.*, 2011). En este trabajo se propuso la formulación de una vacuna en un comprimido, partiendo del sistema vacunal DFAtag/antígenos el cual está compuesto de antígenos inmovilizados en el almidón, material que se ha utilizado como excipiente de compresión directa que facilita su fabricación. Por otra parte, se consideró que por vía oral sólo hay reportado el uso de una vacuna en tabletas, exclusiva para su administración a los militares en EE. UU y que se compone de dos tabletas, una con adenovirus tipo 4 y otra con adenovirus tipo 7, cada una con recubrimiento entérico y compuesta de los excipientes lactosa, celulosa microcristalina, polacrilina de potasio y estearato de magnesio (Gray *et al.*, 2018). También se consideró que, con el comprimido, además de buscar proteger al máximo y liberar en el sitio indicado al antígeno, también se buscaba mayor estabilidad de la vacuna en condiciones de almacenamiento.

La integridad estructural de TcDFAtag inmovilizada en el almidón se evaluó *in vitro* mediante análisis SDS-PAGE y western blot. Los SDS-PAGE revelaron bandas en

el peso molecular de 106.9 kDa tanto de la proteína libre como de la proteína durante todo el proceso de fabricación del comprimido con recubrimiento pelicular, lo cual se confirmó con un western blot, indicando que la integridad estructural del antígeno en la formulación se conservaba.

En este trabajo se observó que la administración de la suspensión oral, bajo el esquema de inmunización y las dosis utilizadas, indujo una respuesta de anticuerpos específicos anti-Tc en el día 35, tres semanas después de estar frente al antígeno, y el día 41 con un título de anticuerpos aproximado de 160 000. Sin embargo, este título obtenido con la suspensión no fue alcanzado con la administración del comprimido recubierto. Dado que la respuesta inmune puede verse afectada no solo por el antígeno, sino por factores como la naturaleza del vehículo, la dosis del antígeno y el protocolo de administración (Raghuvanshi *et al.*, 2002), no se puede descartar que la formulación en forma de comprimido pueda ser de utilidad en otro modelo animal, bajo otro esquema de administración y/o en otras dosis.

También resulta importante señalar que, aunque las pruebas cualitativas indicaron que los pasos de adición de excipientes de disgregación, compresión y recubrimiento no afectaron la integridad de la proteína, es posible que, si hayan afectado la inmunogenicidad del antígeno, derivado de la presencia de los componentes del comprimido en el intestino interfiriendo con la presentación y procesamiento antigénico.

Por su parte, la vacunación por vía nasal es muy atractiva debido a que resulta de fácil administración y a diferencia de lo que ocurre por vía oral, el ambiente para el antígeno no es tan drástico en términos de pH y proteasas. Además, en la capa del epitelio de la mucosa nasal también se encuentran las células M y una alta densidad de células dendríticas constituyendo el NALT y que median la respuesta inmune tanto local como sistémica (Pawar *et al.*, 2013; Dehghan, 2018).

El mayor obstáculo para la formulación de vacunas por esta vía sin embargo, es romper la barrera mucosal, presentando al antígeno de manera eficiente al sistema inmunitario de la mucosa y superando la tolerancia natural en las superficies de la mucosa sin causar efectos adversos (Pawar *et al.*, 2013). Otro obstáculo es el mecanismo de depuración mucociliar en el tracto respiratorio, el cual proporciona una defensa contra partículas inhaladas incluyendo bacterias e irritantes (Pandey *et al.*, 2010). Los sistemas portadores poliméricos como vehículos de administración de vacunas mejoran la captación nasal y la respuesta inmune (Pawar *et al.*, 2013). El sistema DFAtag-antígenos ha demostrado reunir las condiciones para su administración por esta vía, en especial por el tamaño de partícula que está entre 2 y 4  $\mu\text{m}$ , pues se ha visto que para una administración eficaz de vacunas por vía nasal, el tamaño de la partícula debe ser inferior a 10  $\mu\text{m}$ , lo que permite una eficiente interacción con las células del sistema inmune y potenciar la mucoadhesión (Pirouzmand *et al.*, 2016).

La integridad estructural de TcDFAtag inmovilizada en el almidón administrada vía nasal también se evaluó *in vitro* mediante análisis SDS-PAGE y western blot, observándose bandas en el peso molecular de la proteína (106.9 kDa) después de haber estado en contacto con el PVA al 2%.

La suspensión administrada vía nasal en el esquema y dosis señaladas obtuvo un título aproximado de 50 000 al día 41. Título superior al obtenido con la vacuna que contenía el PVA al 2% como mucoadhesivo, en cuyo caso el título fue de  $\sim 3000$ . Esto podría indicar que las partículas de almidón sin el PVA pudieron ser transportadas más fácilmente a través de la mucosa nasal y alcanzar la capa subepitelial que es altamente irrigada por los vasos linfáticos y capilares. Sin embargo, es importante resaltar que en ambos casos el título de anticuerpos obtenido es superior a lo reportado con otros sistemas de entrega a base de polímeros naturales en ensayos de inmunización intranasal que también utilizaron conejos y como antígeno modelo a la toxina tetánica. Por ejemplo, las microesferas de alginato con las que obtuvieron un título anticuerpos de  $\sim 1000$  en el día 42 (Tafaghodi *et al.*, 2006) y con microesferas de dextrano se obtuvo un título de  $\sim$

1000 en el mismo día (Sajadi *et al.*, 2008). En ambos estudios administraron toxina tetánica adsorbida en aluminio como adyuvante mediante inyección intramuscular, obteniendo un título de ~ 9000.

También resulta importante resaltar que durante el periodo de administración no se observaron signos de irritación nasal, por lo que se descarta que el daño a la mucosa fuera la razón de la falta de respuesta, además que el PVA se utiliza en formulaciones oftálmicas para humano como Liquifilm®, Refresh®Classic y Murine®.

Otros sistemas administrados por esta vía, tales como la combinación de antígenos con CpG o encapsulados de alginato pueden modular la respuesta e inducir la secreción de citocinas Th1 como INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Dehghan, 2018). Estudios previos con el sistema DFAtag-almidón habían demostrado que puede participar en la modulación de la respuesta inmune hacia el antígeno, favoreciendo un perfil de respuesta inmune celular hacia el antígeno Acr de *M. tuberculosis* cuando se administró vía nasal a ratones Balb-c sanos en un esquema de dos dosis repetidas cada 21 días (Moreno-Mendieta *et al.*, 2014). Sin embargo, en el modelo de estudio (conejos Nueva Zelanda sanos), con el antígeno TcDFAtag y bajo un esquema de administración de cada 7 días con refuerzo al día 35 y sin importar la presencia o no de una formulación, no se observó la polarización de la respuesta.

Hasta aquí y con los ensayos realizados no es posible determinar si la adición de los excipientes para la formulación oral, especialmente el almidón que es insoluble afectó la presentación del antígeno, pues como demostraron los ensayos *in vitro*, ni la adición de los excipientes ni el proceso de fabricación del comprimido afectaron de forma visible a la proteína. Para la formulación nasal por su parte, tampoco es posible esclarecer si el PVA afecta la inmunogenicidad de la proteína. Es posible que monitorear la respuesta de anticuerpos más allá de los 41 días podría haber permitido observar la consolidación y maduración de la respuesta. Sin embargo, no puede descartarse a futuro probar otros excipientes como diluyentes o bien realizar la formulación de una suspensión o preparación en polvo para atomizar.

## 10. CONCLUSIONES

La integridad de la proteína recombinante fragmento C de la toxina tetánica (TcDFAtag) inmovilizada en almidón se mantuvo durante el proceso de fabricación de los comprimidos recubiertos para administración oral y también después de estar en contacto con el alcohol polivinílico al 2% utilizado como mucoadhesivo para la administración intranasal, tal como lo indicaron los análisis de SDS-PAGE y western blot.

Ningunas de las dos formas farmacéuticas administradas por vía oral y nasal provocó algún efecto adverso durante el estudio.

La administración por vía oral e intranasal de la suspensión de la vacuna generó respuesta inmune de anticuerpos específicos anti Tc en los conejos Nueva Zelanda, siendo mayor la respuesta por la vía oral.

La respuesta inmune inducida fue principalmente humoral.

La respuesta de anticuerpos obtenida es incluso mayor que la reportada en otros ensayos de inmunogenicidad en conejos utilizando otros acarreadores poliméricos. Sin embargo, la respuesta inmune de los conejos que recibieron las formas farmacéuticas no fue mayor a la de los animales que recibieron la vacuna en suspensión.

Es la primera vez que se demuestra que el sistema almidón-DFAtag-antígenos funciona en otro modelo animal más grande (conejos Nueva Zelanda) y que a diferencia de los ratones no es singénico.

## 11. REFERENCIAS

**Adenovirus Type 4 and Type 7 Vaccine.** Ficha Técnica (2014). Package Insert - Adenovirus Type 4 and Type 7 Vaccine, Live, Oral. U.S. Food and Drug Administration (FDA) .<https://www.fda.gov/media/80211/download>

**Ahmad** Y. Abuhelwa, Desmond B. Williams, Richard N. Upton, David J. R. Foster. (2016). Food, gastrointestinal pH, and models of oral drug absorption. *Eur J Pharm Biopharm.*112: 234-248.

**Apostólico**, J., Lunardelli, V. A., Coirada, F. C., Boscardin, S. B., & Rosa, D. S. (2016). Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *J Immunol Res.* 2016: 1459394.

**Audran** Régine, Peter Katrin, Dannull Jens, Men Ying, Scandella Elke, Groettrup Marcus, Gander Bruno, Corradin Giampietro. (2003). Encapsulation of peptides in biodegradable microspheres prolongs their MHC class-I presentation by dendritic cells and macrophages in vitro. *Vaccine.* 21(11-12): 1250–1255.

**Bahamondez-Canas** Tania F., Cui Zhengrong. (2018). Intranasal immunization with dry powder vaccines. *Eur J Pharm Biopharm.* 122: 167-175.

**Bastola** Rakesh, Noh Gyubin, Keum Taekwang, Bashyal Santosh, Seo Jo-Eun, Choi, Yeosu Oh Jaewoong, Cho YoungSik, Lee Sangkil. (2017). Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Arch Pharm Res.* 40(11): 1238-1248.

**Bernocchi**, B. Carpentier, R. Betbeder, D. (2017). Nasal nanovaccines. *In Int J Pharm.* 530(1–2): 128-138.

**Betbeder**, D.; Sperandio, S.; Latapie, J.P.; de Nadai, J.; Etienne, A.; Zajac, J.M.; Frances, B. (2000). Biovector nanoparticles improve antinociceptive efficacy of nasal morphine. *Pharm Res.* 17(6): 743-748.

**Bobbala** Sharan, Hook Sarah. (2016). Is There an Optimal Formulation and Delivery Strategy for Subunit Vaccines?. *Pharm Res.* 33(9): 2078–2097.

**Carrizo** Juan T. (2008). Historia de las vacunas. En Manual de vacunas (3-6). Venezuela: Medica Panamericana.

**Caubet** Jean-Christoph, Ponvert Claude. (2014). Vaccine Allergy. *Immunol Allergy Clin N Am.* 34: 597–613.

**Chonkar**, A., Nayak, U., & Udupa, N. (2015). Smart Polymers in Nasal Drug Delivery. *Indian J Pharm Sci.* 77(4): 367–375.

**Chung** E. H. (2014). Vaccine allergies. *Clin Exp Vaccine Res.* 3(1): 50–57.

**Costantino** Henry R., Illum Lisbeth, Brandt Gordon, Johnson Paul H., Quay. Steven C. (2007). Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. *Int J Pharm.* 337(1-2): 1–24.

**Coucke** D., Schotsaert M., Libert C., Pringels E., Vervaet C., Foreman P., Saelens X., Remon J. P. (2009). Spray-dried powders of starch and crosslinked poly(acrylic acid) as carriers for nasal delivery of inactivated influenza vaccine. *Vaccine.* 27: 1279–1286.

**Davitt** Christopher J.H., Lavelle Ed C. (2015). Delivery strategies to enhance oral vaccination against enteric infections. *In Adv Drug Deliv. Rev.* 91: 52-69.

**De Temmerman** Marie-Luce, Rejman Joanna, Demeester Jo, Darrell J. Irvine, Gander Bruno, C. De Smedt Stefaan. (2011). Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. *In Drug Discov Today.* 16(13–14): 569-582.

**Degenhard** Marx, Gerallt Williams and Matthias Birkhoff. (2015). Intranasal Drug Administration — An Attractive Delivery Route for Some Drugs. *Drug Discovery Dev.* 299-320

**Dehghan** S, Kheiri MT, Abnous K, Eskandari M, Tafaghodi M. (2018). Preparation, characterization and immunological evaluation of alginate nanoparticles loaded with whole inactivated influenza virus: Dry powder formulation for nasal immunization in rabbits. *Microb Pathog.* 115: 74-85.

**Dukoral®.** Ficha Técnica. (2004) Dukoral: EPAR - Product Information. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP).

**Elamanchili** P, Diwan M, Cao M, Samuel J. (2004). Characterisation of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells. *Vaccine.* 22: 2406–2412.

**Farmacopea** de los Estados Unidos Mexicanos(FEUM)11va edición.

**Gänger**, S., & Schindowski, K. (2018). Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics.* 10(3): 116.

**García** Sánchez Ma Jose, Santos Buelga Dolores. (2001). Formas sólidas orales. En *Tecnología Farmacéutica (Volumen II) Vila Jato (87-155)*. Madrid: Síntesis.

**Garcon** Nathalie, Hem Stanley, Friede Martin. (2012). Evolution of adjuvants across the centuries. *Vaccines: Sixth Edition*, 58–70.

**Garcon** Nathalie, Leroux-Roels Geert, Cheng Wen-Fang. (2011). Vaccine adjuvants. *Perspect. Vaccinology.* 1(1): 89–113

- Ghori** Muhammad U., Mahdi Mohammed H., Smith Alan M., Conway Barbara R.(2015). Nasal Drug Delivery Systems: An Overview. *Am J Pharmacol Sci.* 3(5): 110-119.
- Gray** Gregory C., Erdman Dean D. (2018). 10 - Adenovirus Vaccines. In Plotkin's Vaccines (121-133.e8). London: Elsevier.
- Guillén** D., Moreno-Mendieta S, Pérez R, Espitia C, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R. (2014). Starch granules as a vehicle for the oral administration of immobilized antigens. *Carbohydr Polym.* 112: 210-215.
- Guillén** D., Moreno-Mendieta, S., Aguilera, P. I. (2013). The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97: 4141.
- Guillén** D., Sánchez, S. & Rodríguez-Sanoja, R. (2010). Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85: 1241.
- Hemal** Tandel, Kiruba Florence, Ambikanandan Misra. (2011). 9 - Protein and Peptide Delivery through Respiratory Pathway. In Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics (429-479). India: Elsevier.
- Hornbeck**, P. (1991), Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Curr Protoc Immunol.* (Suppl 1): 2.1.1-2.1.22.
- Karch**, C. P., & Burkhard, P. (2016). Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochem Pharmacol.* 120: 1–14.
- Kharenko** E. A., Larionova N. I. and Demina N. B. (2009) Mucoadhesive Drug Delivery Systems (Review). *Pharm. Chem. J.* 43(4): 21 – 29
- Kim**, I.D.; Shin, J.H.; Kim, S.W.; Choi, S.; Ahn, J.; Han, P.L.; Park, J.S.; Lee, J.K.(2012). Intranasal delivery of HMGB1 siRNA confers target gene knockdown and robust neuroprotection in the postischemic brain. *Mol Ther.* 20: 829–839.
- Kushwaha** Swatantra K.S., Keshari Ravi Kuma, Rai A.K.. (2011). Advances in nasal trans-mucosal drug delivery. *J Appl Pharm Sci.* 01 (07): 21-28
- Lai**, S.K.; O’Hanlon, D.E.; Harrold, S.; Man, S.T.; Wang, Y.Y.; Cone, R.; Hanes, J.(2007). Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc Natl Acad Sci.* 104 (5): 1482-1487.
- Lawal** Mariam V. (2018). Modified Starches as Direct Compression Excipients – Effect of Physical and Chemical Modifications on Tablet Properties: A Review. *Starch-Starke.* 71(1-2): 1800040.
- Leroux-Roels** Geert. (2010). Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine.* (Suppl 3): C25–C36.

**Lycke**, Nils. (2012). Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol.* 12(8): 592–605.

**Mak Tak W.** (2006). 23 - Vaccines and Clinical Immunization. In *The Immune Response* (695-749). San Diego, U.S.A: Academic Press.

**Mansuri** Shakir, Kesharwani Prashant, Jain Keerti, Tekade Rakesh K., Jain N.K. (2016). Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *React Funct Polym.* 100:151-172

**Martínez Cruz**, Leticia. (2018). Estabilidad de proteínas inmovilizadas en almidón (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

**Morefield** Garry L. (2011). A Rational, Systematic Approach for the Development of Vaccine Formulations. *The AAPS Journal.*13(2): 191-200.

**Moreno Santurino** Marco Antonio. (2010). Comercialización de un medicamento. En *Tratado de Medicina Farmacéutica* (540-543). Madrid: Médica Panamericana.

**Moreno-Mendieta** SA, Guillén D, Espitia C, Hernández-Pando R, Sanchez S, Rodríguez-Sanoja R. (2014). A novel antigen-carrier system: the *Mycobacterium tuberculosis* Acr protein carried by raw starch microparticles. *Int J Pharm.* 474(1-2):241-8.

**Moreno-Mendieta** y Rodríguez-Sanoja. (2016). Uso de micropartículas de polímeros como vehículo de antígenos. *BioTecnología.* 20: 35-54.

**Moreno-Mendieta**, SA, Barrera-Rosales, A, Mata-Espinosa, D, Barrios-Payán, J, Sánchez, S, Hernández-Pando R, Rodríguez-Sanoja, R. (2019). Raw starch microparticles as BCG adjuvant: Their efficacy depends on the virulence of the infection strains. *Vaccine.* 37:5731-5737.

**Moreno-Mendieta**, SA, Barrios-Payán, J, Mata-Espinosa, D, Sánchez, S, Hernández-Pando, R, Rodríguez-Sanoja, R. (2017). Raw starch microparticles have immunostimulant activity in mice vaccinated with BCG and challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine.* 35:5123-5130.

**Moyer**, T. J., Zmolek, A. C., & Irvine, D. J. (2016). Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *J Clin Invest.* . 126(3): 799–808.

**Nagar** Priyanka, Singh Kusum, Chauhan Iiti, Verma Madhu, Yasir Mohd, Khan Azad, Sharma Rajat and Gupta Nandini.(2011). Orally disintegrating tablets: formulation, preparation techniques and evaluation. *J Appl Pharm.* 01(04): 35-45

**Narayan**, P. (2011). Overview of Drug Product Development. *Curr Protoc Pharmacol.* (Suppl 55): 7.3.1-7.3.29.

**Naser** Abdel Zaid and Qaddomi Aiman. (2012). Development and stability evaluation of enteric coated Diclofenac sodium tablets using Sureteric. *Pak J Pharm Sci.* 25(1): 59-64.

**Nasiri** Zadeh, Samira, Rajabnezhad, Saeid, Zandkarimi, Majid, Dahmardeh, Somayeh, Mir, Leyla, Darbandi, Mohammad Ali and Rajabnejad, Mohammad Reza (2017). Mucoadhesive microspheres of chitosan and polyvinyl alcohol as a carrier for intranasal delivery of insulin: in vitro and in vivo studies. *J Bioequivalence Bioavailab.* 3 (2): 00030.

**Nelson** F Eng, Nitin Bhardwaj, Rebecca Mulligan, Francisco Diaz-Mitoma. (2013). The potential of 1018 ISS adjuvant in hepatitis B vaccines HEPLISAV™ review. *Hum Vaccin Immunother.* 9(8): 1661–1672.

**O'Hagan** Derek T, Fox Christopher B. (2015). New generation adjuvants--from empiricism to rational design. *Vaccine.* 33(Suppl 2): B14–B20.

**Pandey** RS, Babbar AK, Kaul A, Mishra AK, Dixit VK. (2010). Evaluation of ISCOM matrices clearance from rabbit nasal cavity by  $\gamma$  scintigraphy. *Int J Pharm.* 398(1-2): 231-236.

**Pasetti**, M. F., Simon, J. K., Szein, M. B., & Levine, M. M. (2011). Immunology of Gut Mucosal Vaccines. *Immunol Rev.* 239(1): 125–148.

**Pawar** D, Mangal S, Goswami R, Jaganathan KS. (2013). Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity. *Eur J Pharm Biopharm.* 85(3): 550-559.

**Perrie** Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE, Bramwell VW. (2008). Vaccine adjuvant systems enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int J Pharm.* 364: 272–280.

**Pirouzmand**, H., Khameneh, B., & Tafaghodi, M. (2017). Immunoadjuvant potential of cross-linked dextran microspheres mixed with chitosan nanospheres encapsulated with tetanus toxoid. *Pharm. Biol.* 55(1): 212–217.

**Plotkin** S. (2014). History of vaccination. *PNAS.* 111(34): 12283–12287.

**Plotkin** SA, Plotkin SL. (2011). The development of vaccines: how the past led to the future. *Nat Rev Microbiol.* 9(12): 889-93.

**Polio Sabin™ (Oral)**. Ficha Tecnica. (2015) Vacuna antipoliomielítica oral Tipo Sabin trivalente. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/173504/0383M79.pdf>

**Porter** SC. (2000). Coating of pharmaceutical forms. In *The Science and Practice of Pharmacy* (1036-1046). U.S.A.: Lippincot Williams & Wilkins.

**Pujara** CP, Shao Z, Duncan MR, Mitra AK. (1995). Effects of formulation variables on nasal epithelial cell integrity: Biochemical evaluations. *Int J Pharm.* 114(2):197-203.

**Pulendran**, B., y Ahmed, R. (2011). Mecanismos inmunológicos de la vacunación. *Nat Immunol.* 12 (6): 509-517.

**Quevedo** Francisco L. (2008). Breve historia de las vacunas. En *Vacunas en Pediatría* (2-7). Bogotá: Editorial Medica Panamericana.

**Raghuvanshi** RS, Katare YK, Lalwani K, Ali MM, Singh O, Panda AK (2002). Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *Int J Pharm.* 245:109–21.

**Reed** SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. (2008). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Ther Immunol.* 30(1):23-32.

**Rodriguez-Sanoja** Romina, Guillén Santos Daniel, Sanchez Esquivel Sergio. Patente No. 347183. Denominación: Dominio de fijación al almidón derivado y uso en inmovilización de proteínas recombinantes sobre almidón para purificación estabilización y acarreador de antígenos y proteínas terapéuticas para inmunización en mucosas. Expedición 4 de abril 2017.

**Rossetto** O. , Scorzeto M., Megighian A., Montecucco C. (2012). Tetanus neurotoxin. *Toxicon.* 66: 59–63.

**Rowe**, R., Sheskey, P., & Owen, S. (2009). Crospovidona. In *Handbook of pharmaceutical excipients* (184-185). London: Pharmaceutical Press.

**Rudnic** EM, Schwartz JD. *Oral Solid Dosage Forms*. Remington *The Science and Practice of Pharmacy*. 20<sup>a</sup> Ed. E.U.A: ed. Lippincot Williams & Wilkins; 2000. 882-885.

**Sajadi** Tabassia S. Abolghasem, Tafaghodia Mohsen, Reza Jaafari Mahmoud. (2008). Induction of high antitoxin titers against tetanus toxoid in rabbits by intranasal immunization with dextran microspheres. *Int J Pharm.* 360(1-2): 12-17.

**Seju**, U.; Kumar, A.; Sawant, K.K. (2011). Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: In vitro and in vivo studies. *Acta Biomater.* 7(12): 4169-4176.

**Sheena** H. Wang, Afton L. Thompson, Anthony J. Hickey, Herman F. Staats. (2012). Dry Powder Vaccines for Mucosal Administration: Critical Factors in Manufacture and Delivery. *Curr Top Microbiol Immunol.* 354: 121–156

**Smart** J.D. (2005).The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv. Drug Delivery Rev.* 57(11):1556-1568

**Stillo**, M., Carrillo Santistevé, P., & Lopalco, P. L. (2015). Safety of human papillomavirus vaccines: a review. *Expert Opin Drug Saf.* 14(5): 697–712.

**Subodh** Bhardwaj. (2018). 21 – Vaccines. In *Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research* (341-353). U.S.A: Academic Press

**Tafaghodi** Mohsen, Sajadi Tabassi S. Abolghasem, Reza Jaafari Mahmood. (2006). Induction of systemic and mucosal immune responses by intranasal administration of alginate microspheres encapsulated with tetanus toxoid and CpG-ODN. *Int J Pharm.* 319(1-2): 37-43.

**Tak** W. Mak, Mary E. Saunders, Bradley D. Jett. (2014). 14 – Vaccination. In *Primer to the Immune Response* (333-375). U.S.A: Academic Cell.

**Tanaka** Akiko, Furubayashi Tomoyuki, Tomisaki , Kawakami Mayuko, Kimura Shunsuke, Daisuke Inoue, Kosuke Kusamori, Hidemasa Katsumi, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto,(2017).Nasal drug absorption from powder formulations: The effect of three types of hydroxypropyl cellulose (HPC). *Eur J Pharm* .96:284-289

**The European Medicines Agency (2004)**. Guideline On Adjuvants In Vaccines For Human Use. Committee For Medicinal Products For Human Use (CHMP), (134716).

**Tlaxca** José L., Scott Ellis, Richard L. Remmele, J. (2015). Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: potential and challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* 93: 56–78.

**Tritto** Elaine, Mosca Flaviana, De Gregorio Ennio. (2009). Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine.* 27(25-26): 3331–3334.

**Vartak**, A., & Sucheck, S. J. (2016). Recent Advances in Subunit Vaccine Carriers. *Vaccines.* 4(2): 12.

**Wang**, X.; Chi, N.; Tang, X. (2008). Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting. *Eur J Pharm Biopharm.* 70(3): 735-740.

**Woensel** Matthias van, Wauthoz Nathalie, Rosière Rémi, Amighi Karim, Mathieu Véronique, Lefranc Florence, W. van Gool Stefaan and Vleeschouwer Steven. (2013). Formulations for Intranasal Delivery of Pharmacological Agents to Combat Brain Disease: A New Opportunity to Tackle GBM?. *Cancers.* 5(3):1020-1048.

**Yousefi** Mehdi, Tahmasebi Fathollah, Younesi Vahid, Razavi Alireza, Khoshnoodi Jalal, Ahmad Bayat Ali, Abbasi, Hodjatallah Rabbani Ebrahim, Jeddi-Tehrani Mahmood Shokri , Fazel. (2013). Characterization of neutralizing monoclonal

antibodies directed against tetanus toxin fragment C. *J Immunotoxicol.* 11(1): 28–34.

**Zhang**, Q.Z.; Zha, L.S.; Zhang, Y.; Jiang, W.M.; Lu, W.; Shi, Z.Q.; Jiang, X.G.; Fu, S.K. (2006). The brain targeting efficiency following nasally applied MPEG-PLA nanoparticles in rats. *J Drug Target.* 14(5):281–290.

**Zhao** Liang, Seth Arjun, Wibowo Nani, Zhao Chun-Xia, Mitter Neena, Yu Chengzhong, Middelberg Anton P.J. (2013). Nanoparticle vaccines. *Vaccine.* 32(3): 327–337.

## 12. ANEXOS

### ANEXO 1. Producción y purificación de la proteína $\alpha$ -amilasa.

Para producir la enzima se preparó un preinóculo de *Lactobacillus amylovorus* que secreta la proteína  $\alpha$ -amilasa. Esta bacteria se sembró al 1% en medio MRS a partir del preinóculo y se dejó incubando durante 16 h. Posteriormente se centrifugó (10 minutos a 10 000 rpm a 4°C) y se recolectó el sobrenadante, desechando las células. Se agregó almidón previamente lavado (3 veces con agua deionizada y la última con amortiguador de citrato-fosfato 0.025 M pH 5) y se dejó incubando durante 2 h, una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó (a 8000 rpm durante 5 minutos a 4°C) se separó el sobrenadante y se conservó el almidón que tenía unida la proteína por medio del DFA. Se realizaron 5 lavados con amortiguador de citrato-fosfato 0.025 M pH 5, posteriormente se eluyó con solución de  $\beta$ -ciclodextrina 8 mM. Se recolectó el sobrenadante de cada elución y se refrigeró. Se realizó diálisis con punto de corte de 50 micras para obtener la proteína limpia y se cuantificó por absorbancia a 280 nm y se inmovilizó la cantidad seleccionada en la cantidad de almidón correspondiente. Para el secado se retiró el sobrenadante y se colocó etanol al 50%, se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos a 4°C y posteriormente se colocó etanol absoluto, se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos a 4°C, y se dejó secar a temperatura ambiente.

### ANEXO 2. Zimograma

Es una técnica electroforética que permite observar actividad de enzimas. En este caso se analizó la actividad de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* después de incubar el gel en una solución de almidón. Se corrieron las muestras en un gel desnaturante al 10% de poliacrilamida (SDS-PAGE) a un voltaje constante de 20 mA. Después de la electroforesis, los geles se lavaron dos veces con amortiguador citrato-fosfato 20 mM pH 5 durante 15 minutos a temperatura ambiente y se dejó incubando durante la noche en el mismo amortiguador a 4° C.

Se retiró el amortiguador y se adicionó una solución de almidón al 0.5% en amortiguador citrato-fosfato 20 mM pH 5 y se dejó incubando 2 h a temperatura ambiente con agitación. Las bandas de proteínas que contienen actividad amilolítica se visualizaron mediante tinción con una solución de yodo al 2%.

### **Tinción de Plata**

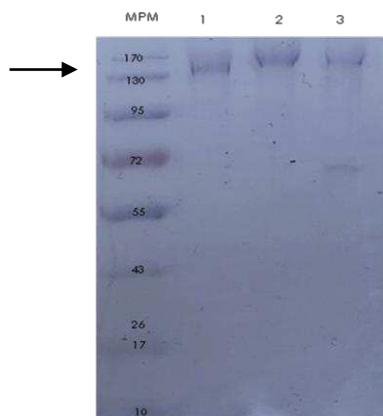
La muestra se corrió en SDS-PAGE al 10% a un voltaje constante de 20 mA, posteriormente se realizó la tinción utilizando el kit Dodeca™ Silver Stain, BioRad Cat No.1610480, se colocaron durante toda la noche en solución de fijación (etanol: ácido acético (5:1)), se sensibilizaron durante 30 minutos y se lavaron con agua desionizada. La tinción se llevó a cabo utilizando una solución de nitrato de plata al 2% durante 30 minutos seguido de un lavado cuidadoso con agua megapura durante un 1 minuto. El gel se reveló durante 15 minutos hasta que aparecieron bandas de proteína, y la reacción se detuvo lavando con solución de paro durante 10 minutos, posteriormente se lavó con agua megapura.

### **ANEXO 3. Producción y purificación de la Proteína Recombinante TcDFAtag**

Para la producción de la proteína recombinante TcDFAtag como se especifica en Guillén *et al.*, 2013, se creció un preinóculo durante 24 h a 29°C en medio LB con ampicilina (100 µg/mL) para activar a las células, posteriormente se sembraron al 1% en 1 L del mismo medio y se creció durante 15 h a 29°C. Cuando el cultivo alcanzó una D.O. de 0.5–0.6 se agregó el inductor (IPTG 0.1 mM) y se dejó incubando por 6 h. Posteriormente se cosecharon las células y se lavaron con amortiguador citrato-fosfato 20 mM pH 7.0. Las células se lisaron por sonicación dando tres pulsos de 60 Hz por 10 s con amortiguador de lisis (citrato-fosfato 20 mM pH 7.0, inhibidor de proteasas 1:1000, tritón al 1% y maltosa 10 mM) y dejando reposar 1 min entre cada pulso. El lisado se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 15000 rpm y se apartó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió nuevamente en amortiguador y se sonicó dando tres pulsos de 20 s de duración y

al finalizar se juntó el nuevo lisado con el sobrenadante obtenido anteriormente. Nuevamente se centrifugó a 15000 rpm durante 15 min y se recolectó el sobrenadante donde se encuentra la proteína de fusión.

Para la purificación, el lisado obtenido se incubó con el almidón (SIGMA S4180) previamente lavado (tres veces con 25 mL de agua mega pura y el ultimo lavado con 25 mL de amortiguador citrato-fosfato 20 mM pH 7 entre cada lavado se centrifugaron a 8000 rpm por 4 min) durante 2 h, en agitación ligera a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 8000 rpm durante cuatro minutos a 4°C, se separó el sobrenadante y recuperó el almidón con la proteína unida por medio del DFAtag. Una vez realizados los lavados se eluyó con solución de  $\beta$ -ciclodextrina 8 mM preparada en el amortiguador citrato-fosfato 20 mM pH 7.0. Se realizó diálisis con membrana de punto de corte de 50 micras para obtener la proteína limpia y sin  $\beta$ -ciclodextrina. La cuantificación se realizó por espectrofotometría midiendo la D.O. a 280 nm y con el coeficiente teórico de extinción molar, para posteriormente inmovilizar la cantidad seleccionada en la cantidad de almidón correspondiente.



**Figura 21.** Gel SDS-PAGE al 10% que muestra **MPM:** Marcador de peso molecular (Prestained Protein Ladder), 1-3: Eluatos del 1 al 3. La flecha indica la ubicación de TcDFAtag en su peso molecular (106.9 kDa).

Para el secado se retiró el sobrenadante y se colocó etanol al 50% se centrifugó por 5 minutos a 8000 rpm y posteriormente se colocó etanol absoluto y se centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos, dejando secar a temperatura ambiente.

#### **ANEXO 4. Electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE)**

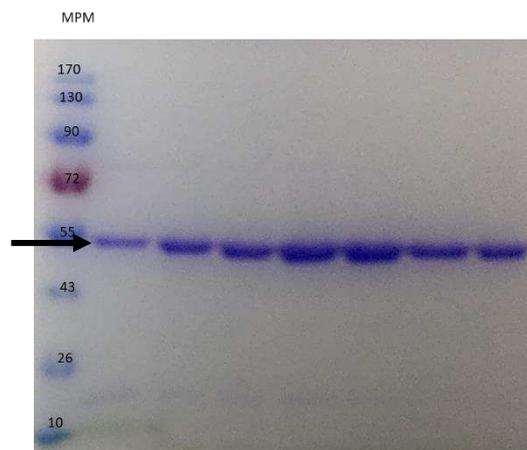
Los geles para SDS-PAGE consistieron en un gel de separación al 10% y el gel de concentración al 4% según Laemmli, 1970. El marcador de peso molecular de la proteína (Broad Range Standard BioRad) se utilizó como referencia, la muestra se dejó correr en el gel dentro de una cámara electroforética a 20 mA. Después del SDS-PAGE, el gel se tiñó con azul Coomassie al 0.2% durante 20 minutos. El gel se decoloró usando una solución destinción que contenía etanol-ácido acético glacial (20:10).

#### **Western blot**

Se corrieron las muestras en un gel SDS-PAGE al 10% y se transfirió durante 1.5 horas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon-P, Merck) a 60V y se dejó secar durante toda la noche a temperatura ambiente. La membrana fue bloqueada en 3% (p/v) de leche descremada en polvo e incubada en una dilución 1/5000 de anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-histidinas en Tween 20 al 0.05% y amortiguador fosfato salino (PBS) durante 1.5 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron tres veces con PBS-Tween al 0.05% (PBS-T) durante 5 minutos y se incubó en dilución 1/5000 de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón unida a fosfatasa alcalina (invitrogen) en PBS-T 0.05% durante 1.5 hora. Después de los lavados, la detección se realizó utilizando el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP)/ nitroazul de tetrazolio (NBT) (invitrogen), el cual desarrolla una reacción azul oscuro insoluble y permanente en la presencia de fosfatasa alcalina.

## ANEXO 5. Producción y purificación de la Proteína Tc

Se cultivaron células *E. coli* BL21 (DE3) que expresan la proteína Tc en medio LB suplementado con ampicilina (100 g / mL) durante 12 h a 29 ° C. La expresión de proteínas se indujo mediante la adición de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,1 mM, y la incubación se continuó a 29 ° C durante 6 h. Las células se recolectaron (10 000rpm durante 10 min a 4 ° C) y ser lisaron por sonicación con amortiguador de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, Tritón al 1%, inhibidor de proteasa 1:1000). Las proteínas se purificaron utilizando un sistema AKTA Prime (GEHealthcare) por cromatografía de afinidad a una columna de Ni<sup>2+</sup>. Después de lavados exhaustivos con amortiguador de unión, la proteína unida se eluyó con amortiguador de elución (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 500mM) a una velocidad de 1 ml / min durante 40 min.



**Figura 22.** Gel SDS-PAGE al 10% que muestra **MPM:** Marcador de peso molecular (Prestained Protein Ladder), Eluatos de Tc . La flecha indica la ubicación de Tc en su peso molecular (53.6 kDa).

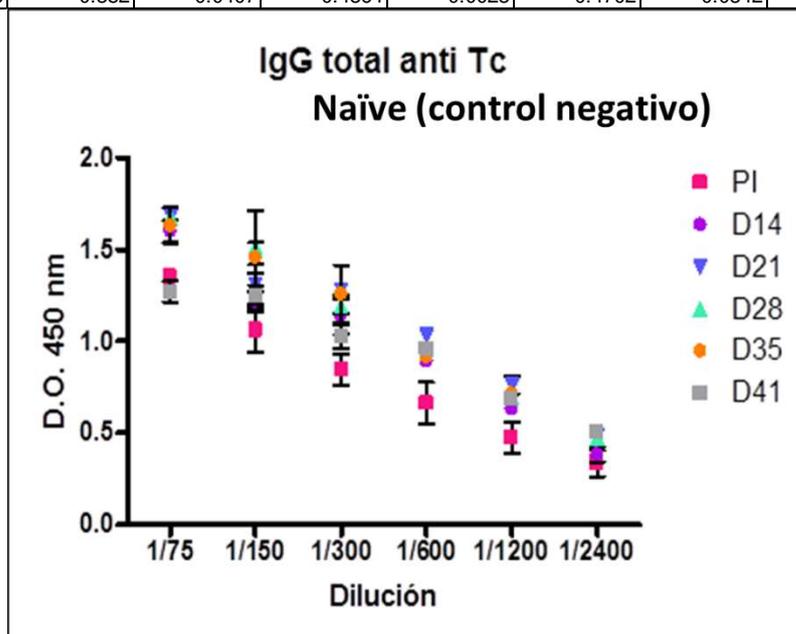
## **ANEXO 6. Obtención de Células de bazo y cultivo**

Cada bazo se dividió en tres partes y se colocó en 800  $\mu$ L de medio RPMI-1640 sin complementar (Gibco, USA) en tubos de 1.5 mL. Se maceraron y filtraron por una malla de 70  $\mu$ m, se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm a 4°C, y se eliminó el sobrenadante, las células se resuspendieron con un 1 mL de solución de lisis, se incubaron en hielo durante 4 minutos y se volvió a centrifugar (5 minutos a 1500 rpm) el paso se repitió hasta la remoción total de los eritrocitos. Las células se resuspendieron y se lavaron dos veces con el medio RPMI + suero fetal bovino (SFB) 5% (Gibco, USA). Finalmente, el pellet celular se resuspendió en 1 mL del medio y el número total de células y viabilidad se determinaron haciendo tinción con azul de tripano 0.4%. Después del conteo se centrifugaron las células 5 minutos a 1200 rpm, se desechó el sobrenadante y se le añadió 1 mL del medio de congelación (DMSO 10%, SFB 90%) al pellet celular y se congeló a -70°C hasta su uso.

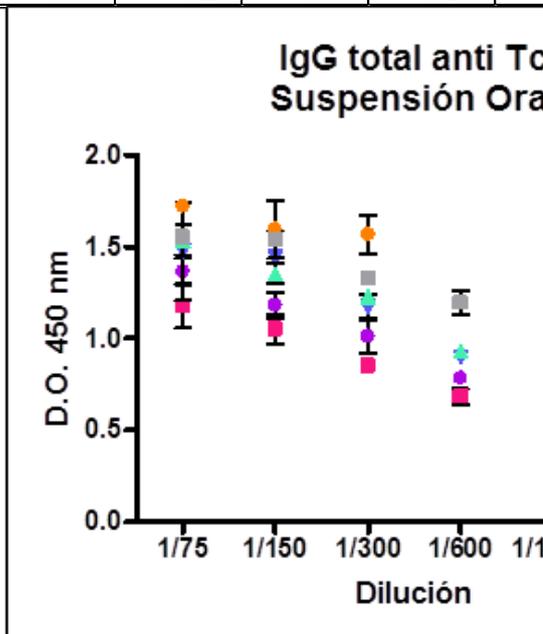
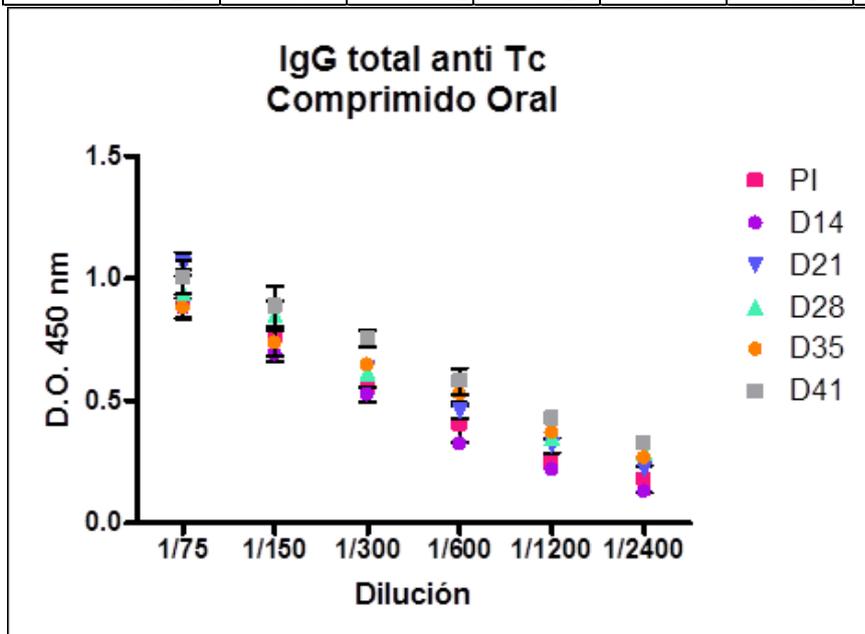
Para el cultivo, las células se descongelaron pasando de -70°C a baño de 37°C, se pasaron con 5 mL de RPMI complementado sólo con SFB 10% y Anti-Anti 1X, precalentado a 37 °C y se centrifugó a 1500 rpm, 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante por decantación y se repitió el lavado. Se adicionó 1 mL del medio y se repitió el conteo con el azul de tripano (90  $\mu$ L del azul de tripano 0.4% y 10  $\mu$ L de las células). Se centrifugó a 1500 rpm, 5 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante por decantación.

## ANEXO 7. Anticuerpos IgG anti Tc expresados en absorbancia

NAÏVE	PI		D14		D21		D28		D35
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X
75	1.3527	0.0264	1.5984	0.0583	1.6824	0.0016	1.6784	0.0221	1.6305
150	1.0604	0.1168	1.2169	0.0579	1.308	0.1092	1.5087	0.2034	1.4558
300	0.8443	0.0882	1.1415	0.1053	1.2816	0.0023	1.1904	0.0396	1.2573
600	0.6628	0.1136	0.8919	0.0148	1.0333	0.0055	0.9527	0.0356	0.9149
1200	0.4737	0.087	0.6329	0.0311	0.7615	0.0494	0.6918	0.0115	0.7138
2400	0.3342	0.0718	0.382	0.0407	0.4864	0.0023	0.4702	0.0342	0.5079

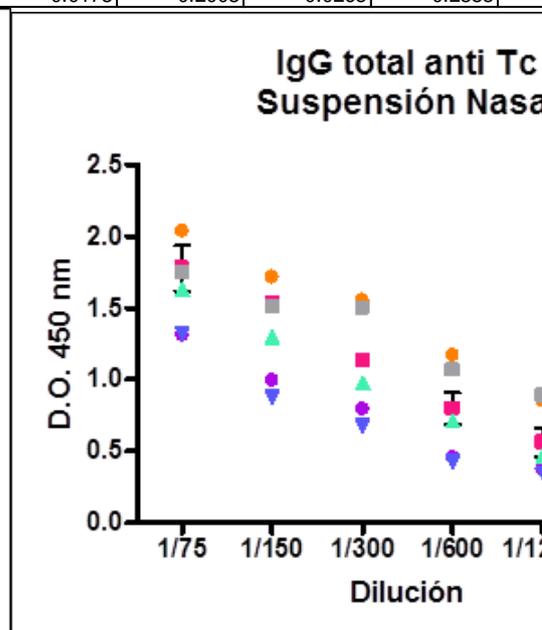
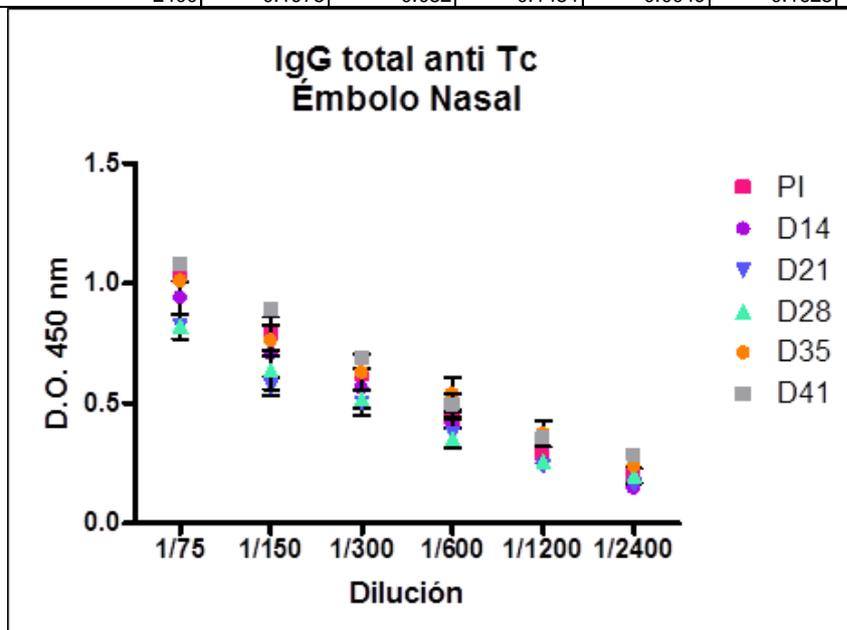


COMPRIMIDO ORAL	PI		D14		D21		D28		D35	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
75	0.9067	0.0219	0.8773	0.0412	1.0594	0.0471	0.9383	0.0974	0.8797	
150	0.7634	0.0293	0.6888	0.029	0.8702	0.0287	0.8478	0.061	0.7371	
300	0.558	0.0192	0.5247	0.0326	0.6301	0.0254	0.6127	0.0061	0.6467	
600	0.4034	0.0743	0.3226	0.0013	0.4596	0.0325	0.5505	0.0138	0.5269	
1200	0.2501	0.0229	0.2185	0.0052	0.3167	0.0302	0.3482	0.0156	0.3699	
2400	0.1786	0.0542	0.1286	0.0054	0.2182	0.0048	0.288	0.0051	0.2657	



SUSPENSIÓN ORAL	PI		D14		D21		D28		D35	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
75	1.1771	0.122	1.3657	0.075	1.4752	0.267	1.5383	0.0846	1.7233	
150	1.0511	0.0832	1.1804	0.0718	1.4433	0.144	1.3563	0.0537	1.5963	
300	0.8507	0.0182	1.0119	0.0884	1.1738	0.066	1.2293	0.0377	1.5682	
600	0.6836	0.0425	0.7845	0.0309	0.8998	0.0277	0.9316	0.0069	1.199	
1200	0.4728	0.0383	0.5094	0.0569	0.634	0.0194	0.7126	0.0267	1.0952	
2400	0.2832	0.0275	0.3119	0.0221	0.4314	0.0199	0.5163	0.024	0.8013	

ÉMOLO NASAL	PI		D14		D21		D28		D35	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
75	1.0512	0.0009	0.9395	0.0701	0.82	0.0525	0.8215	0.0199	1.0093	
150	0.7884	0.0706	0.7049	0.0194	0.5729	0.038	0.6377	0.0793	0.7611	
300	0.6208	0.0144	0.5618	0.0824	0.5014	0.0547	0.5171	0.0037	0.6286	
600	0.4339	0.0388	0.4043	0.0124	0.3737	0.0623	0.3534	0.0103	0.538	
1200	0.2845	0.0208	0.2474	0.021	0.2365	0.0085	0.2597	0.0105	0.3727	
2400	0.1978	0.032	0.1454	0.0049	0.1628	0.0173	0.2003	0.0265	0.2388	



SUSPENSIÓN NASAL	PI		D14		D21		D28		D35	
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE
75	1.7772	0.1599	1.3108	0.1232	1.3147	0.1461	1.633	0.0777	2.0374	
150	1.5335	0.0325	0.9953	0.026	0.8777	0.0626	1.2994	0.0921	1.7149	
300	1.1299	0.032	0.7942	0.0883	0.6789	0.0636	0.9807	0.0205	1.5551	
600	0.7978	0.1101	0.4551	0.0933	0.4284	0.0136	0.7134	0.033	1.1695	
1200	0.5612	0.098	0.3755	0.0049	0.3462	0.0051	0.4724	0.0051	0.8524	
2400	0.3956	0.0526	0.2782	0.0107	0.3091	0.0007	0.4071	0.0146	0.6203	

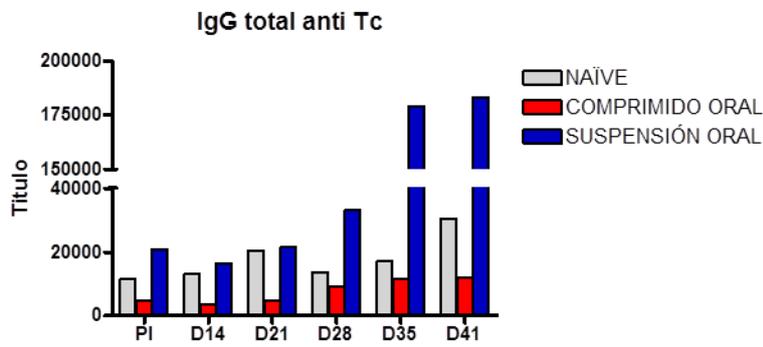
## ANEXO 8. Anticuerpos IgG anti Tc expresados como título

Los datos de absorbancia fueron procesados con el software de escritorio MyAssays (MyAssays Ltd, Sussex, UK, <http://parameter-logistic-curve.assay>) para calcular el título de cada muestra, utilizando el análisis de **Regresión Logística** método, la absorbancia de fondo promedio (Blanco) se resta primero de la absorbancia de cada muestra. Estas mediciones se grafican contra los pasos de dilución (1:75-1:2400) transformados a log10 (eje x) y a continuación se realiza la regresión resultante. El promedio de las absorbancias medidas para el Anticuerpo Secundario solamente se grafica como una línea horizontal. Cada muestra se calcula como la coordenada X para la intersección entre la línea de regresión y el promedio de solo A

La grafica final de título se obtuvo restando el valor de título del suero preinmune

	<b>G5</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
	<b>NAÍVE</b>	<b>COMPRESIDO ORAL</b>	<b>SUSPENSIÓN ORAL</b>	<b>ÉMOLO NASAL</b>	<b>SUSPENSIÓN NASAL</b>
PI	11390	4613	20910	6958	13520
D14	13110	3645	16390	6479	20350
D21	20520	4867	21400	8744	58080
D28	13610	9296	33090	10950	16260
D35	17060	11640	179300	12750	28360
D41	30360	11870	182900	10080	65920
MENOS PREINMUNE					
D14	1720	-968	-4520	-479	6830
D21	9130	254	490	1786	44560
D28	2220	4683	12180	3992	2740
D35	5670	7027	158390	5792	14840
D41	18970	7257	161990	3122	52400
EJE A 0					
D14	1720	0	0	0	6830
D21	9130	254	490	1786	44560
D28	2220	4683	12180	3992	2740
D35	5670	7027	158390	5792	14840
D41	18970	7257	161990	3122	52400

## TITULO TOTAL



## MENOS EL SUERO PREINMUNE

